

# **MTA DOKTORA PÁLYÁZAT**



## **ONKOHEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEK KORSZERŰ GENETIKAI JELLEMZÉSE**

**Dr. Bödör Csaba**

**Semmelweis Egyetem**

**I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet**

**MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport**

**2020.**

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>5</b>
<b>I BEVEZETÉS .....</b>	<b>9</b>
<b>II HEMOPOEZIS ÉS ONKOHEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEK KIALAKULÁSA.....</b>	<b>9</b>
II.1 Lymphoid malignitások .....	11
II.1.1 Follicularis lymphoma .....	12
II.1.1.1 Az FL diagnózisa.....	12
II.1.1.2 Az FL prognózisa .....	13
II.1.1.3 Az FL patogenezise.....	14
II.1.1.4 Az FL genetikai háttere .....	16
II.1.1.4.1 Az epigenetikai szabályozó gépezet mutációi FL-ben .....	16
II.1.1.4.2 Az mTOR útvonal mutációi FL-ben .....	18
II.1.1.4.3 A B-sejt receptor útvonal komponenseinek mutációja FL-ben.....	18
II.1.1.5 Az FL kezelése .....	18
II.1.1.6 Az FL transzformációja.....	20
II.1.2 Krónikus lymphocytás leukémia (CLL) .....	21
II.1.2.1 A CLL diagnózisa .....	21
II.1.2.2 A CLL prognózisa .....	22
II.1.2.3 A CLL patogenezise .....	23
II.1.2.4 A CLL genetikai háttere .....	23
II.1.2.5 A CLL kezelése .....	25
II.1.2.5.1 Terápia-indukált klonális evolúció CLL-ben.....	26
II.1.2.5.2 Célzott terápiák CLL-ben .....	27
II.1.2.5.3 Ibrutinib terápia CLL-ben .....	27
II.1.2.5.4 Ibrutinib rezisztencia kialakulása CLL-ben .....	28
II.2 Myeloid malignitások .....	30
II.2.1 Myeloproliferatív neopláziák.....	31
II.2.1.1 Esszenciális thrombocythaemia (ET).....	31
II.2.1.2 Primer myelofibrózis (PMF) .....	32
II.2.1.3 Driver mutációk jelentősége.....	33
II.2.1.3.1 JAK2 V617F mutáció.....	34
II.2.1.3.2 MPL mutációk.....	35
II.2.1.3.3 Calreticulin mutációk .....	35
II.2.1.4 Driver mutációk klinikai jelentősége ET-ben és PMF-ben .....	36
II.2.1.5 Driver mutációk mennyiségi meghatározása .....	37
II.2.2 Familiáris myeloid megbetegedések .....	38
II.2.2.1 Germline RUNX1 mutációk talaján kialakuló familiáris myeloid kórképek.....	40
II.2.2.2 Germline GATA2 mutációk talaján kialakuló familiáris myeloid kórképek .....	41
II.2.2.3 Germline TERC mutációk kapcsán kialakuló familiáris myeloid kórképek .....	42
II.2.2.4 Germline eltérések genetikai vizsgálatának jelentősége .....	43
<b>III CÉLKITŰZÉS.....</b>	<b>45</b>
<b>IV ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>46</b>
IV.1 Vizsgálati minták .....	46
IV.1.1 Follicularis lymphoma .....	46
IV.1.2 Krónikus lymphocytás leukémia.....	47
IV.1.3 Familiáris myeloid kórképek .....	48
IV.1.4 Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák.....	50
IV.2 DNS és RNS izolálás .....	50
IV.3 Teljes genomszekvenálás.....	51
IV.4 Teljes exomszekvenálás .....	51
IV.5 Célzott új-generációs szekvenálás .....	52
IV.6 Sanger szekvenálás .....	53



IV.7 Droplet digitális PCR (ddPCR).....	55
IV.8 Valós-idejű kvantitatív PCR (RQ-PCR) .....	55
IV.9 Fragmenshossz-analízis .....	55
IV.10 Immunhisztokémiai analízis: <i>CALR</i> mutációk fehérje-szintű kimutatása.....	56
IV.11 Multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA).....	58
IV.12 Bioinformatikai analízisek .....	61
IV.13 Statisztikai analízisek .....	62
IV.14 Etikai vonatkozások .....	63
IV.15 Pályázati támogatások .....	63
<b>V EREDMÉNYEK.....</b>	<b>64</b>
V.1 Follicularis lymphoma transzformációjának feltérképezése és új mutációs célpontok azonosítása .....	64
V.1.1 Az FL transzformációjának genom-szintű mutációs profilja.....	64
V.1.2 FL transzformáció evolúciós mintázatai .....	67
V.1.2.1 Klonális események azonosítása az FL patogenezisében és transzformációjában.....	67
V.1.2.2 Közös progenitor klón (CPC) koncepció az FL transzformációjában .....	70
V.2 Az <i>EZH2</i> mutációk feltérképezése és klinikai jelentőségük meghatározása folliculáris lymphomában.....	72
V.2.1 <i>EZH2</i> mutációk vizsgálata hagyományos Sanger szekvenálással .....	72
V.2.2 <i>EZH2</i> mutációk funkcionális vizsgálata .....	73
V.2.3 <i>EZH2</i> mutációk vizsgálata új-generációs szekvenálással .....	74
V.3 Célzott terápia szelekciós nyomására kialakuló evolúciós folyamatok feltérképezése krónikus lymphocytás leukémiában.....	77
V.3.1 Ibrutinib indukálta klonális evolúció mintázatai CLL-ben.....	77
V.3.1.1 A <i>BTk</i> , <i>PLCG2</i> és <i>TP53</i> mutációk szubklonális dinamikája.....	80
V.3.2 A betegcsoport klinikai követése .....	83
V.3.3 <i>BTk</i> rezisztencia mutációk szenzitív nyomkövetése CLL-ben.....	84
V.3.4 Térbeli szubklonális heterogenitás és konvergens evolúció azonosítása CLL-ben .....	85
V.4 Driver mutációk mennyiségi feltérképezése és fehérje-szintű kimutatása Philadelphia kromoszóma negatív krónikus myeloproliferatív neopláziákban .....	89
V.4.1 A vizsgált Ph- MPN betegcsoport driver mutációs profilja.....	89
V.4.1.1 Calreticulin mutációk megoszlása.....	90
V.4.2 <i>JAK2</i> V617F és <i>CALR</i> mutációk mennyiségi meghatározása ET-ben és PMF-ben .....	92
V.4.2.1 <i>JAK2</i> V617F VAF összefüggése a klinikai paraméterekkel .....	92
V.4.2.2 <i>CALR</i> variáns allélfrekvencia és a klinikai paraméterek összefüggése.....	93
V.4.3 <i>CALR</i> mutációk fehérje-szintű mennyiségi meghatározása ET-ben és PMF-ben .....	95
V.4.3.1 <i>CALR</i> mutációs státusz meghatározása CAL2 IHC eljárás alkalmazásával .....	95
V.4.3.2 <i>CALR</i> mutáns alléltömeg összefüggése a klinikummal .....	98
V.4.3.3 Fehérje-szintű és molekuláris adatok összefüggése .....	99
V.5 Csírvonalbeli genetikai eltérések azonosítása familiáris myeloid onkohematológiai kórképekben.....	101
V.5.1 JAK-STAT útvonal kooperáló mutációinak azonosítása <i>RUNX1</i> mutáns FPD-AML-ben teljes exomszekvenálással.....	101
V.5.2 <i>ASXL1</i> kooperáló mutációk azonosítása <i>GATA2</i> mutáns familiáris MDS-ben.....	107
V.5.3 További hazai familiáris MDS/AML családok azonosítása .....	109
V.5.3.1 <i>TERC</i> deléción azonosítása familiáris MDS/AML háttérben.....	109
V.5.3.2 Familiáris MDS/AML családok ismeretlen genetikai háttérrel .....	110

<b>VI</b>	<b>MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>112</b>
<b>VII</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>121</b>
<b>VIII</b>	<b>AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK .....</b>	<b>123</b>
VIII.1	A jelölt első- vagy utolsószerzős közleményei az értekezés témájában .....	123
VIII.2	Az értekezés témájához kapcsolódó kollaborációs közlemények.....	126
<b>IX</b>	<b>TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK AZ MTMT2 ALAPJÁN.....</b>	<b>128</b>
<b>X</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>130</b>
<b>XI</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>151</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**AID:** aktiváció indukálta citidin-deamináz  
**AML:** akut myeloid leukémia  
**ANKRD26:** „ankyrin repeat domain-containing protein 26”  
**ARID1A:** „AT-rich Interactive Domain Containing Protein 1A”  
**ASXL1:** „ASXL Transcriptional Regulator 1”  
**ATM:** „ataxia telangiectasia mutated 2”  
**aUPD:** szerzett uniparentális diszómia („acquired uniparental disomy”)  
**BCI:** Barts Cancer Institute  
**BCL:** „B-cell lymphoma” géncsalád  
**BCOR:** „BCL6 Corepressor”  
**BCR:** B-sejt receptor  
**BIRC3:** „Baculoviral IAP repeat-containing protein 3”  
**BMF:** csontvelőelégtelenséggel járó szindróma („bone marrow failure”)  
**BNLI:** „British National Lymphoma Investigation” csoport  
**BTK:** Bruton-féle tirozin-kináz  
**CALR:** Calreticulin  
**CARD11:** „Caspase Recruitment Domain Family Member 11”  
**CBF:** „core binding factor”  
**CCF:** tumorsejtfrakció („cancer cell fraction”)  
**ccfDNS:** keringő sejtmentes DNS („circulating cell-free DNA”)  
**CD:** „cluster of differentiation” sejtfelszíni marker  
**CEBPA:** „CCAAT/enhancer-binding protein alpha”  
**CFU:** kolóniaképző egység („colony forming unit”)  
**CLL:** krónikus lymphocytás leukémia  
**CLL-IPI:** „CLL International Prognostic Index”  
**CME:** konvergens mutációs evolúció („convergent mutation evolution”)  
**CML:** krónikus myeloid leukémia  
**CNV:** DNS-kópiaszám változások („copy number variations”)  
**CPC:** közös progenitor sejt  
**CR:** komplett remisszió  
**CREBBP:** „CREB Binding Protein”  
**CXCR:** C-X-C kemokin receptor  
**DC:** dyskeratosis congenita  
**ddPCR:** droplet digitális PCR  
**DDX41:** „DEAD-box helicase 41”  
**del17p:** 17p deléción  
**DLBCL:** diffúz nagy B-sejtes lymphoma  
**DNS:** deoxiribonukleinsav  
**GVHD:** graft vs. host betegség  
**EBF1:** „EBF Transcription Factor 1”  
**ECOG:** „Eastern Cooperative Oncology Group”

**EGA:** „European Genome-phenome Archive”  
**EP300:** „E1A Binding Protein P300”  
**ERIC:** „European Research Initiative on CLL”  
**ESMO:** „European Society of Medical Oncology”  
**ET:** esszenciális thrombocythaemia  
**ETV6:** „ETS translocation variant 6”  
**EZH2:** „Enhancer of Zeste Homolog 2”  
**FA:** allélikus terhelés („fractional abundance”)  
**fDC:** follicularis dendritikus sejt  
**FFPE:** formalinban fixált, paraffinba ágyazott minta  
**FISH:** fluoreszcens *in situ* hibridizáció  
**FL:** follicularis lymphoma  
**FLIPI:** „Follicular Lymphoma International Prognostic Index”  
**FLIS:** *in situ* follicularis lymphoma  
**FLLC:** follicularis lymphoma-szerű sejt (follicular lymphoma-like cell)  
**FOXO1:** „Forkhead Box O1 Protein”  
**FPD:** familiáris vérlemezké funkciózavar fokozott MDS/AML rizikóval  
**GATA:** „GATA binding protein”  
**GC:** centrum germinativum  
**G-CSFR:** granulocita-kolóniasztimuláló faktor receptor  
**GELF:** „Groupe d’Etude des Lymphomes Folliculaires” csoport  
**GL:** germline  
**Gy:** gray  
**HL:** Hodgkin-lymphoma  
**HSC:** hemopoetikus őssejt  
**HSCT:** hemopoetikus őssejtranszplantáció („hemopoietic stem cell transplant”)  
**Ig:** immunglobulin  
**IgH:** immunglobulin nehézlánc  
**IGHV-M:** IGHV mutáció pozitív („mutated”)  
**IGHV-U:** IGHV mutáció negatív („unmutated”)  
**IHC:** immunhisztokémia  
**indel:** inzerciók és delécioók  
**iwCLL:** „International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia”  
**JAK2:** Janus-2 kináz  
**KMT2D:** „Histone-Lysine N-Methyltransferase 2D” (korábbi nevén: MLL2)  
**LDH:** laktát-dehidrogenáz  
**LLMPP:** „Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project”  
**LOH:** heterozigotáság elvesztése („loss of heterozygosity”)  
**MBL:** monoklonális B-sejtes lymphocytosis  
**MDS:** myelodysplasiás szindróma  
**MEF2B:** „Myocyte Enhancer Factor 2B”  
**MLPA:** multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció  
**MPL:** myeloproliferatív leukémia gén (thrombopoetin receptor)  
**MPN:** myeloproliferatív neopláziák

**mRNS:** hírvivő RNS („messenger RNA”)  
**MTOR:** „Mammalian Target of Rapamycin”  
**MYD88:** „Myeloid differentiation primary response gene 88”  
**NCCN:** „National Comprehensive Cancer Network”  
**NF- $\kappa$ B:** „Nuclear Factor  $\kappa$ B”  
**NGS:** új-generációs szekvenálás („next generation sequencing”)  
**NHL:** non-Hodgkin lymphoma  
**NK:** természetes ölüsejt  
**NOTCH1:** „Notch homolog 1”  
**ORR:** teljes válaszadási arány („overall response rate”)  
**OS:** teljes túlélés („overall survival”)  
**p: kromoszóma rövid karja**  
**PBMC:** perifériás vérből származó mononukleáris sejt  
**PCR:** polimeráz láncreakció („polymerase chain reaction”)  
**PFS:** progressziómentes túlélés („progression-free survival”)  
**Ph kromoszóma:** Philadelphia kromoszóma  
**PI3K:** foszfatidil-inozitol-3-kináz  
**PLC $\gamma$ 2:** „Phospholipase C Gamma 2”  
**PMF:** primer myelofibrózis  
**POD24:** 2 éven belüli progresszió („progression of disease within 2 years”)  
**PR:** parciális remisszió  
**PV:** polycythaemia vera  
**q:** kromoszóma hosszú karja  
**R-B:** rituximab-bendamustin  
**R-CHOP:** rituximab-ciklofoszfamid-doxorubicin-vinkrisztin-prednizolon  
**R-CLB:** rituximab-chlorambucil  
**RFC:** rituximab, fludarabin, ciklofoszfamid  
**RNS:** ribonukleinsav  
**RQ-PCR:** valós-idejű kvantitatív PCR  
**RRAGC:** „Ras Related GTP Binding C”  
**RUNX1:** „Runt-related transcription factor 1”  
**SF3B1:** „splicing factor 3b subunit 1”  
**SLL:** kis lymphocytás lymphoma  
**SNV:** egy pontos nukleotid variáns („single nucleotide variant”)  
**SOCS1:** „Suppressor of Cytokine Signaling 1”  
**STAT:** „signal transducer and activator of transcription”  
**T-ALL:** T-sejtes akut lymphoblastos leukémia  
**TBD:** telomerázbiológiát érintő kórképek („telomerase biology disorders”)  
**TERC:** „telomerase RNA component”  
**TERT:** telomeráz reverz transzkriptáz  
**TFH:** segítő follicularis sejt  
**tFL:** transzformált follicularis lymphoma  
**TNFAIP3/A20:** „TNF-alpha Induced Protein A3”  
**TNFRSF14:** „TNF Receptor Superfamily Member 14”)

**TPO:** thrombopoetin

**TP53:** tumor protein p53

**VAF:** variáns allélfrekvencia

**WES:** teljes exomszekvenálás („whole-exome sequencing”)

**WGS:** teljes genomszekvenálás („whole-genome sequencing”)

**WHO:** Egészségügyi Világszervezet („World Health Organization”)

## I BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedben az onkohematológiai kórképek genetikai hátterének megismerése során robbanásszerű fejlődés szemtanúi lehettünk. Ennek hátterében döntően az új-generációs szekvenálás (NGS) megjelenése és egyre szélesebb körben való alkalmazása áll, aminek köszönhetően szinte valamennyi onkohematológiai entitás teljes genetikai kódját megismertük. A nagy mennyiségű genomikai információ a legtöbb hematológiai malignus kórkép diagnosztikus kritériumait és rizikóbecslését is alapjaiban változtatta meg. Ez számos esetben a korszerű kezelések hatékonyságát előrejelző és a betegség monitorozására alkalmas prediktív biomarkerek felfedezéséhez is vezetett, ami molekuláris eltéréseken nyugvó diagnosztikus algoritmusok, prognosztikus rendszerek és a célzott terápiák hatékonyságát előrejelző és nyomon követni képes biomarkerekre épülő molekuláris diagnosztikai eljárások megjelenését eredményezte az onkohematológiában.

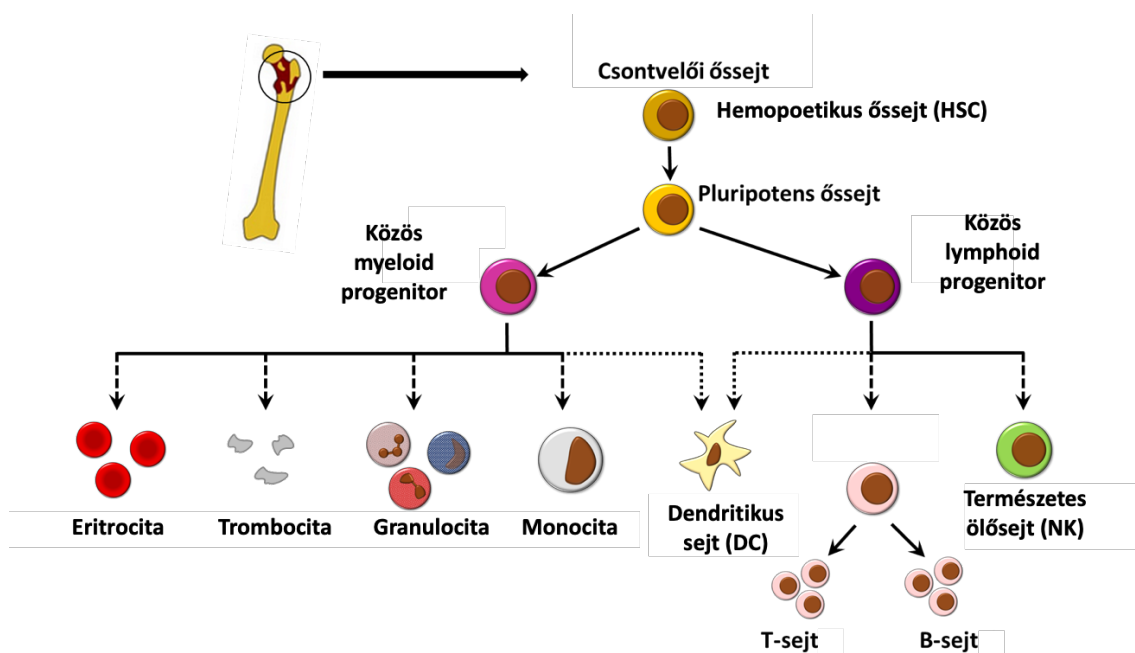
Az alább ismertetett megfigyelések a jelölt munkájának szemelvényeit mutatják be, amely eredmények az elmúlt évtizedben az onkohematológiai kórképek genetikai hátterének feltárására irányuló kutatások eredményeként születtek, a kórképcsoportot reprezentáló négy különböző modell entitást vizsgálva, örökletes és szerzett genetikai eltérések vonatkozásában.

## II HEMOPOEZIS ÉS ONKOHEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEK KIALAKULÁSA

A vér alakos elemei a csontvelői hemopoézis során jönnek létre. A vérképzés kiindulópontja a csontvelői hemopoetikus őssejt (HSC), amely képes valamennyi sejtvonal irányába történő elköteleződésre, és egyúttal nagy replikációs potenciáljának köszönhetően biztosítja a folyamatos sejttutánpótlást. A pluripotens HSC differenciálódása során kolóniaképző egységeket (CFU) hoz létre, melyekből a különböző transzkripciós faktorok hatására létrejönnek a lymphoid és myeloid rendszer előalakjai. A lymphoid sejtvonal progenitor sejtjei a csontvelőben, illetve a perifériás nyirokszövetekben létrehozzák az érett T- és B-lymphocytákat, valamint az NK-sejteket. A myeloid irányba elköteleződött őssejtek felelősek az erythrocyta-CFU, megakaryocytá-CFU és granulocytá-CFU kialakulásáért, melyek az egyes sejtvonalak érési folyamatai során keresztül vezetnek az érett sejthalakok létrejöttéhez [1]. (1. ábra)

A vérképzés daganatos megbetegedéseit elsősorban a lymphoid és myeloid rendszer érintettsége alapján osztályozzuk. Ezek a klonális folyamatok rendszerint az érési sor gátlásával és az éretlen előalakok felszaporodásával járnak, kialakulásukban pedig olyan szerzett vagy

öröklött genetikai léziók játszanak szerepet, melyek a differenciálódás elmaradásához, fokozott sejtproliferációhoz és az apoptóziskészség elvesztéséhez vezetnek. A hematológiai malignitásokban gyakoriak a sejterést reguláló transzkripciós faktorok, különböző szignáltranszdukciós útvonalak komponenseinek, valamint az epigenetikai szabályozó gépezet enzimeinek mutációi is, melyek a legváltozatosabb mechanizmusokon és útvonalakon keresztül járulnak hozzá a különböző entitások patogeneziséhez [2-6]. A különböző génekben bekövetkező pontmutációk, deléciók/inzerciók és transzlokációk jelentősen befolyásolhatják a kialakuló betegség progresszióját és prognózisát, mindemellett gyakran biomarkerként is szolgálnak, hiszen kvantitatív analízisükkel lehetővé válik a különböző terápiás modalitások hatékonyságának becslése valamint a betegség lefolyásának követése is. A személyre szabott terápia térnyerésének köszönhetően számos genetikai lézió egyben gyógyszercélpontként is szolgál, amely szükségessé teszi a rutin diagnosztikában alkalmazott molekuláris genetikai vizsgálatok folyamatos fejlesztését és érzékenységének növelését.



**1. ábra:** A hemopoezis sematikus ábrázolása. A csontvelői hemopoetikus őssejtből egy szigorúan szabályozott komplex folyamat eredményeképpen alakulnak ki a vérképzőrendszer sejtjes elemei.

A diagnosztikai eljárások fejlődésével a hematológiai malignitások patogenezisében azonosított genetikai eltérések száma is folyamatosan növekszik, amely indokolta a klonális vérképzőszervi megbetegedések klasszifikációjának revízióját. Napjainkban ezen entitások osztályozásában a szövettani kép mellett már a genetikai státusz is meghatározó szerepet tölt



be, ezért a széleskörű molekuláris vizsgálatok szerepe egyre jobban felértékelődik. Mára az onkohematológiai betegségek csoportjában több mint 190 különböző entitást különböztetünk meg. A jelenlegi, Egészségügyi Világszervezet (WHO) által 2016-ban kiadott klasszifikáció egyszerűsített áttekintése a főbb betegségcsoportokkal az 1. táblázatban található [7].

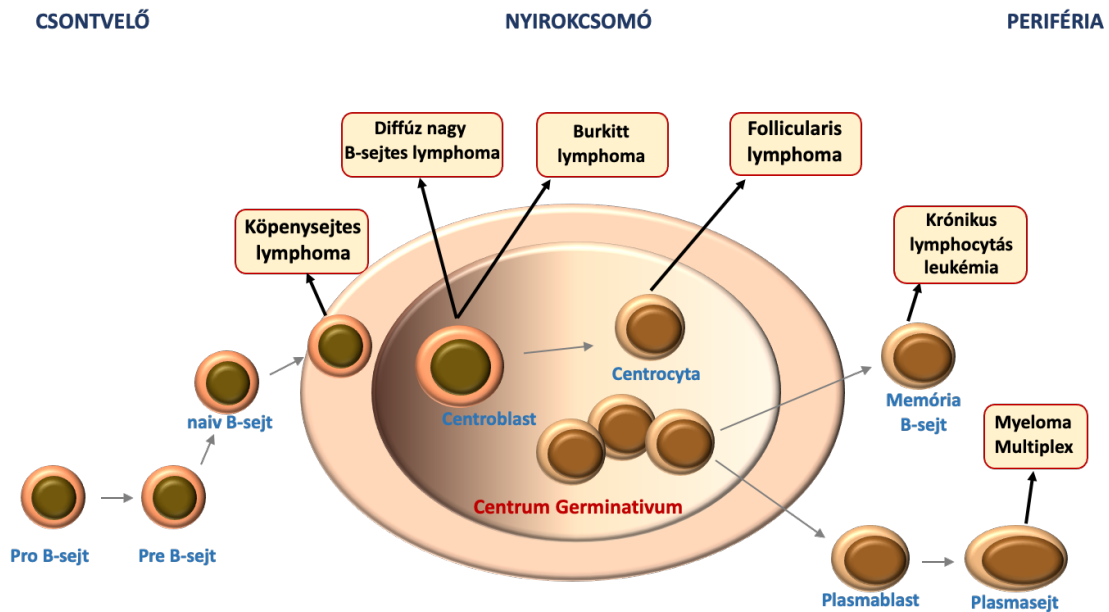
**1. táblázat: A vérképző szervrendszer daganatos megbetegedései\***

<b>Lymphoid rendszer daganatos megbetegedései</b>
B-sejtes lymphoblastos leukémia
T-sejtes lymphoblastos leukémia
Érett B-sejtes lymphomák
Érett T- és NK-sejtes neopláziák
Hodgkin-lymphoma
Transzplantáció-asszociált lymphoproliferatív betegség
Histiocytás és dendritikus sejtes neopláziák
<b>Myeloid rendszer daganatos megbetegedései</b>
Akut myeloid leukémia
Myelodysplasticus szindróma
Myeloproliferatív neopláziák
Myeloid neopláziák germline predispozícióval
Mastocytosis
Myelodysplasticus/myeloproliferatív neopláziák
Myeloid/lymphoid neopláziák eosinophiliával <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> , vagy <i>PCM1-JAK2</i> átrendeződéssel

\*Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2016-os osztályozása alapján

## II.1 Lymphoid malignitások

A lymphoid rendszer daganatos megbetegedései közé számos entitás tartozik, melyek részletes ismertetése túlmutat e dolgozat keretein. Az értekezés tárgyát adó két lymphoid entitás, a follicularis lymphoma (FL) és a krónikus lymphocytás leukémia (CLL) az érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák (NHL) körébe tartozó kórképek. Az érett B-sejtes NHL-ák különböző differenciáltsági fokú B-lymphocyta eredetű daganatos megbetegedések, melyek a B-sejt fejlődés különböző stádiumainak malignus transzformációjából eredeztethetők [6] (2. ábra). A betegségcsoportban gyakoriak az immunglobulin (Ig) gének és különböző proto-onkogének transzlokációi, proto-onkogének és tumorszupresszor gének kópiaszám-eltérései és pontmutációi, melyek számos esetben a konstitutív szignáltranszdukció mediálása által kontrollálatlan sejtproliferációt vagy apoptózisgátlást eredményeznek és patognomikus szerepet töltenek be az egyes kórképek kialakulásában.



**2. ábra:** B-sejtes lymphomák kialakulásának vázlatos ábrázolása. A különböző B-sejtes lymphoma entitások a normál B-sejt fejlődés különböző stádiumaiban történő malignus transzformáció következtében alakulnak ki.

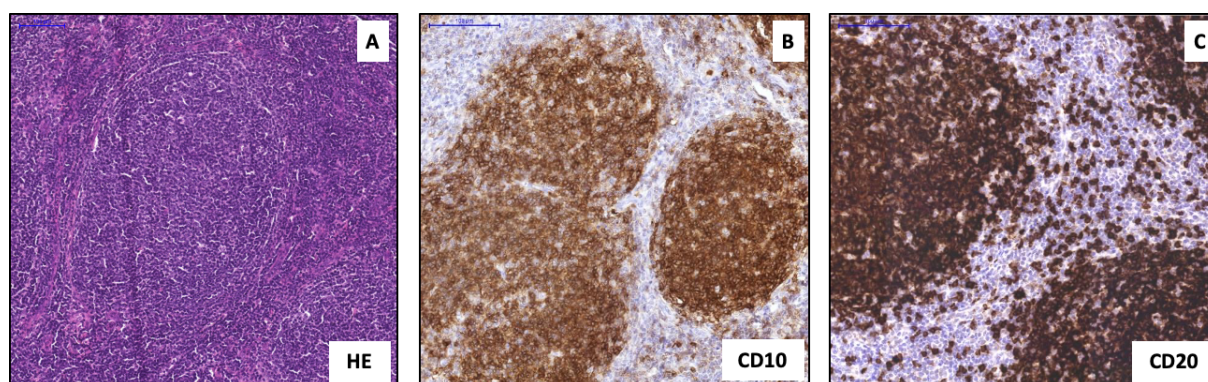
### II.1.1 Follicularis lymphoma

A follicularis lymphoma (FL) a leggyakoribb indolens non-Hodgkin lymphoma, mely a malignus B-sejtes lymphomás megbetegedések mintegy 15-20%-áért tehető felelőssé. Nemzetközi adatok alapján az életkorra normalizált incidenciája 28,1/1 000 000 fő/év. A betegség életkori csúcsa jelenleg 60-70 éves kor közé tehető, a várható élettartam további növekedésével, valamint a diagnosztikus és terápiás eljárások fejlődésével a betegség incidenciájának és prevalenciájának további emelkedése várható.

#### II.1.1.1 Az FL diagnózisa

Az FL leggyakrabban felszínes nyirokcsomókat érintő fájdalomtalan, lassan progrediáló lymphadenopathiával jelentkezik [8]. FL esetén az infiltrált nyirokcsomóból lehetőség szerint excíziós mintavétel történik, illetve egyes esetekben csontvelő biopsziával jutnak szövettani mintához [8]. Az FL szövettani képe az esetek többségében follicularis növekedési mintázatot mutat, melyet centrocyták és centroblastok alkotnak, valamint az elváltozásban reaktív centrum germinativum specifikus T-sejtek és antigénprezentáló follicularis dendritikus sejtek is megtalálhatók (3. ábra). A szövettani beosztás a centroblastok számán alapul: <5 centroblast nagy nagyítású látóterenként I-es grádusú, 6-15 centroblast nagy nagyítású látóterenként II-es grádusú, 15< centroblast nagy nagyítású látóterenként III-as grádusú betegségnek felel meg. A

III-as grádusú szövettani képpel bíró betegséget egybefüggő centroblast területek esetén IIIB, míg ezek hiányában IIIA alcsoportba soroljuk. A hisztopatológiai diagnózishoz a „National Comprehensive Cancer Network” B-sejtes lymphomákról szóló ajánlása alapján nélkülözhetetlen a CD20, CD3, CD5, CD10, BCL2, BCL6, CD21, és CD23 elleni antitestekkel végzett immunhisztokémiai vizsgálat [9]. Az FL-re a CD10+, BCL2+, CD23+/-, CD5-, CD20+, BCL6+ immunfenotípus jellemző, de előfordulnak BCL2- esetek is. Áramlási cytometriával a kappa/lambda könnyűlánc, CD19, CD20, CD5, CD23, és CD10 felszíni markerek vizsgálata javasolt [10].



**3. ábra:** Follicularis lymphoma szövettani megjelenése. **A:** Hematoxylin eosin, **B:** CD10 és **C:** CD20 festéssel kirajzolódó csíráközpontok.

#### II.1.1.2 Az FL prognózisa

Indolens megbetegedés lévén a rituximab terápia megjelenésének köszönhetően az FL 5 éves túlélése mára eléri a 75%-ot, megközelítőleg 15 éves teljes túléléssel [11]. A betegség prognózisának meghatározásánál különösen jelentős a 2 éves progressziómentes túlélés (PFS) megállapítása, mivel az irodalmi adatok szerint a 2 éven belüli relapszusok előfordulása rövidebb várható túlélést eredményez (várható 5 éves túlélés 50% vs. 90%) [12].

A betegség várható lefolyásának megállapítására több prognosztikus modell is született, melyek közül a PFS becslésére legelterjedtebben a „Follicular Lymphoma International Prognostic Index”-et (FLIPI) alkalmazzák, amelyben a rosszabb prognózishoz társuló értékek: életkor  $\geq 60$  év, Ann Arbor stádium III-IV, hemoglobinszint  $< 12$  g/dl, az érintett nyirokcsomó-régiók száma  $> 4$ , és emelkedett szérumszintű LDH koncentráció [13]. A FLIPI modell azonban számos esetben nem bizonyult kellően prediktív értékűnek, ezért több kísérlet is történt a modell kiegészítésére a pontosabb rizikóbecslés érdekében. Ezek közül kiemelkedik az m7-FLIPI klinikogenetikai modell, amely a FLIPI, valamint „Eastern Cooperative Oncology

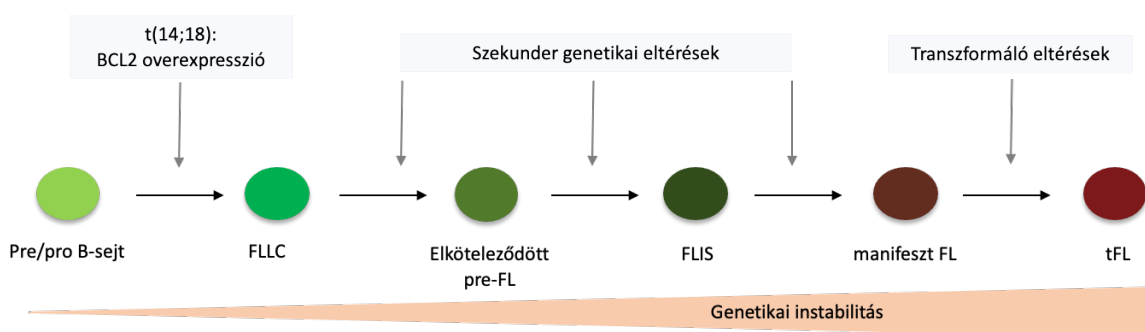
Group” (ECOG) pontszámok mellett hét gén (*EZH2*, *ARID1A*, *EP300*, *FOXO1*, *MEF2B*, *CREBBP*, *CARD11*) mutációs státuszát is figyelembe veszi a prognózis meghatározása során, ezen integratív megközelítés által pedig pontosabb rizikóbecsléshez vezet [14]. A FLIPI modellre épülő rizikóbecslő rendszerek mellett párhuzamos próbálkozások történtek a POD24 modellel, mely a 24 hónapon belül progrediáló betegek esetén rövidebb várható túlélést vetít előre, így a FLIPI modellt mintegy kiegészítve a betegség hosszútávú lefolyásának megítélésére alkalmas [12].

### *II.1.1.3 Az FL patogenezeise*

Az FL-t több más non-Hodgkin lymphomához hasonlóan centrum germinativum eredetű betegségnek tartjuk. A centrum germinativumot a sejtek morfológiája alapján két zónára osztjuk: a sötét zónára, amelyet főként centroblastok alkotnak, amelyekre magas mitotikus ráta, valamint a szomatikus hipermutáció folyamata jellemző, valamint a világos zónára, amelyben centrocyták találhatók, melyek az átrendeződött B-sejt receptor affinitása szerinti szelekción, valamint immunglobulin osztályváltáson mennek keresztül [15]. Az FL és egyéb B-sejtes lymphomák patogenezisében kiemelt szerepet tulajdonítanak a centrum germinativum reakciónak, amely bár a B-sejtek fiziológiás éréséhez járul hozzá, kódolva van benne a genetikai eltérések létrejöttének lehetősége is. A centrum germinativum reakció során az antigén naiv B-sejtek sorozatos osztódáson, szomatikus hipermutáció általi affinitásérésen, receptor revízió, valamint immunglobulin osztályváltáson mennek keresztül, majd az antigénnek megfelelő B-sejt receptorral rendelkező klón a pozitív szelekció eredményeként életben marad és proliferációba kezd [16]. A klonális expanzió a mitotikus fehérjék megnövekedett expressziójának eredményeként jön létre. A szomatikus hipermutáció folyamatához elengedhetetlen az aktiváció indukálta citidin-deamináz (AID) aktivitása, melynek következtében az immunglobulin gének variábilis régiójának szekvenciája módosul, és így egyes klónok immunglobulinjának affinitása megnő az antigén iránt, amely a follicularis dendritikus sejtek (fDC) felszínéhez kötve található. A segítő follicularis sejtekkel (TFH) való kapcsolódás anti-apoptotikus jelátviteli útvonalakat aktivál a nagy affinitású klónokban, melynek segítségével életben maradnak az apoptózist elősegítő környezetben és folytathatják plazmasejtté, vagy memóriasejtté történő differenciálódásukat.

Az FL sejtek immunfenotípusukat, valamint expressziós profiljukat tekintve a legnagyobb hasonlóságot a világos zóna B-sejtjeivel mutatják [17]. A betegség kialakulása azonban már a centrum germinativum reakcióba lépése előtt elkezdődik, az FL patogenezisének

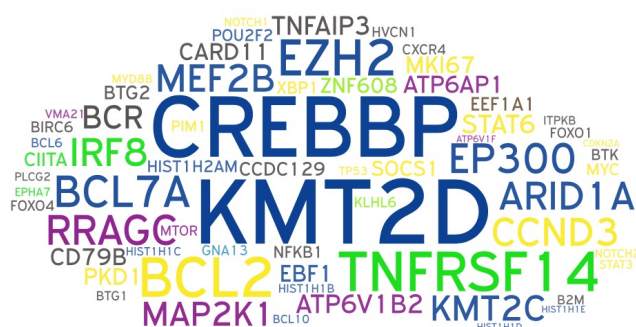
egyik korai momentuma az esetek 85%-ában megjelenő t(14;18)(q32;21) transzlokáció kialakulása, amely a V(D)J rekombináció hibás működése során jön létre a csontvelőben [6, 18]. Az átrendeződés eredményeként a BCL2 antiapoptotikus fehérje génje a 14-es kromoszómán elhelyezkedő IgH gén promóterének szabályozása alá kerül, és megnő az expressziója, ami a transzlokációt hordozó sejtek fokozott túléléséhez vezet [19]. Ugyan a t(14;18) transzlokáció fontos esemény az FL patogenezisében, önmagában nem elegendő a betegség kialakulásához, amit az is bizonyít, hogy egészséges egyének B-sejtjeinek kis hányadában is megtalálható az *IGH/BCL2* génfüzió [20]. A Bcl-2 szint megnövekedésének a patogenezisben valószínűsíthetően a centrum germinativum reakció során van szerepe, mivel a kis affinitású B-sejt receptorral rendelkező sejtek apoptózist elősegítő környezetben lehetővé teszi az antigénhez kis affinitást mutató FL prekursor sejtek (FL-szerű sejtek: FLIC) túlélését és elkötelezett FL common progenitor sejtettké (CPC) való differenciálódását. A centrum germinativum reakció során az onkogének aktivációja, valamint a tumorszuppresszor gének inaktivációja jöhet létre az AID szomatikus mutációk képződését elősegítő aktivitásának köszönhetően, ami a B-sejtek malignus átalakulását eredményezi. A sejtek nem differenciálódnak tovább memória- vagy plazmasejttekké, hanem ismételt belépnek a centrum germinativum reakcióba (ún. „GC-re-entry”), mely által további kromoszóma- és génmutációk felhalmozódása figyelhető meg (4. ábra) [21].



**4. ábra:** Follicularis lymphoma (FL) patogenezisének főbb lépései. A csontvelőben kialakuló t(14;18) transzlokáció FL-szerű sejtek (FLIC) megjelenéséhez vezet, amit további genetikai eltérések akvirálása által elköteleződött FL prekursor sejtek, *in situ* FL (FLIS), majd manifeszt FL kialakulása követ. További, szekunder genetikai eltérések megjelenése vezet a betegség transzformációjához (tFL).

#### II.1.1.4 Az FL genetikai háttere

Az FL genomjának feltérképezése során derült fény arra, hogy a betegség patogeneziséhez számos, eltérő jelátviteli útvonalat érintő mutáció hozzájárul. Szomatikus mutációk figyelhetők meg az epigenetikai szabályozó molekulákat, a B-sejt receptor (BCR) jelátviteli útvonal molekuláit, az mTOR szignalizáció fehérjéit, a B-sejt fejlődést szabályozó útvonal molekuláit, az immunregulációért felelős fehérjéket, és az apoptózisért felelős molekulákat kódoló génekben (5. ábra). Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül, a dolgozat szempontjából releváns néhány mutációs célpont kerül bemutatásra.



**5. ábra:** Follicularis lymphomában (FL) mutációkat hordozó gének génfelhő megjelenítésben. Az egyes gének betűmérete arányos a mutációk FL-ben megfigyelhető gyakoriságával.

##### II.1.1.4.1 Az epigenetikai szabályozó gépezet mutációi FL-ben

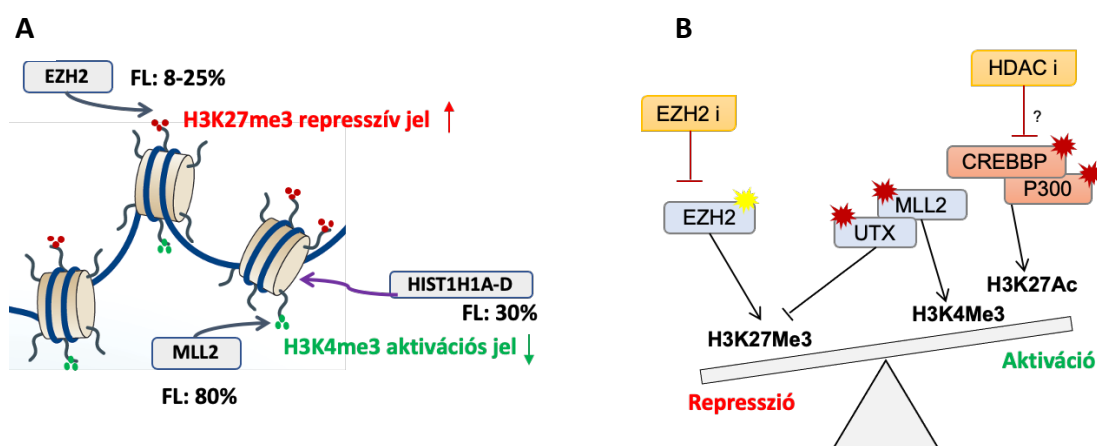
A 2010-es években végzett genom-szintű lymphoma tanulmányok legfőbb hozadékanak az epigenetikai szabályozásban részt vevő molekulák mutációinak és ezek hatásának megismerése bizonyult. Fény derült arra, hogy az epigenetikai szabályozókat érintő mutációk szinte valamennyi FL betegben kimutathatók, sőt a betegek mintegy 60-70%-ában legalább két epigenetikai szabályozó faktor mutációja is megjelenik. Ezen eltérések következtében főképp a hisztonfehérjék poszt-transzlációs módosítása szenved zavart, de jellemző a hisztonfehérjéket kódoló génekben (*HISTH1A-D*) kialakuló mutációk megjelenése is, amely az epigenetikai egyensúly megbomlásához vezet [22, 23].

A *KMT2D* (korábbi nevén *MLL2*) hiszton metil-transzferáz enzim vad típus esetén a H3 hiszton 4-es aminosav pozíciójú lizin (*H3K4*) oldalláncának metilációjával aktiválja a transzkripciót. FL-ben a *KMT2D* tumorsuppresszor génként viselkedik és az esetek 80%-ában megjelenő, funkcióvesztéssel járó mutációi következtében csökken a transzkripciót aktiváló kromatin-jelek mennyisége (6. ábra) [22, 24, 25]. A *CREBBP* és *EP300* hiszton acetyl-



transzferázokat kódoló gének, amelyek a H3 hiszton 27-es pozíciójú lizinjét (H3K27) acetilálják normál esetben, ami fokozza a régióba eső gének transzkripcióját. Az FL-ben szenvedő betegek 60%-ában a *CREBBP*, míg 15%-ában az *EP300* inaktíváló mutációi detektálhatók [22]. A mutált fehérjék csökkent működése által a régióba eső tumorsuppresszor gének, valamint a centrum germinativum reakcióból való kilépésért felelős gének expressziója csökken, elősegítve ezzel az onkogeneizist [26].

Kiemelt szerepet játszik az epigenetikai egyensúly fenntartásában az *EZH2* gén, mely terméke hiszton metil-transzferázként a H3K27 oldallánc metilálásával gátolja a transzkripciót. A kezdeti tanulmányok az FL esetek 8%-ában számoltak be az *EZH2* Y641 kodonját érintő mutációkról, amelyeket funkcióvesztéses eltérésekként jellemeztek [27]. Kutatócsoportunk később ismertetésre kerülő eredményei alapján mára világossá vált, hogy az *EZH2* mutációk az FL betegek mintegy negyedében jelennek meg és funkciónyeréssel jellemezhetők [28-31]. E funkciónyerő mutációk következtében a fokozott hiszton-metilációs állapot gátolja a tumorsuppresszor gének transzkripcióját (6. ábra), amely hozzájárul az onkogenezishez [32]. Az *EZH2* mutációk jelentőségét klinikai szempontból növeli, hogy a funkciónyerő mutációk következtében az *EZH2* potenciális terápiás célpont. Az *EZH2* inhibitorokat már II. fázisú klinikai tanulmányokban alkalmazzák FL kezelésére [33, 34]. Az említett epigenetikai szabályozókban létrejövő mutációk által az egyensúly a transzkripció globális repressziójának irányába billen el, ami több terápiás beavatkozási lehetőséget is magában rejt (6. ábra).



**6. ábra:** Epigenetikai diszreguláció follicularis lymphomában. **A:** Az *EZH2* és *MLL2* hiszton-metiltranszferázok funkciónyerő, illetve funkcióvesztő mutációk gyakorisága és hatása a H3 hiszton metilációs jelek mintázatára. **B:** Az epigenetikai gépezetet érintő funkciónyeréses (sárga jelzés) és funkcióvesztéses mutációk (piros jelzés) a génexpresszió globális repressziójához vezetnek follicularis lymphomában. Az 'EZH2 i' és 'HDAC i' jelzések az *EZH2* és hiszton-deacetiláz gátlók általi lehetséges terápiás beavatkozási pontokat jelölik.

#### II.1.1.4.2 Az mTOR útvonal mutációi FL-ben

Nemrégiben kimutatták az mTOR jelátviteli útvonalat érintő mutációkat is FL-ben. Az *MTOR* gén kódolja az mTOR fehérjét, amely az mTORC1 komplex részeként a transzláció egyik legfőbb szabályozója az eukarióta sejtekben. A komplex a lizoszómák felszínén áll össze és megfelelő aminosav ellátottság esetén aktiválódik. A komplexnek többek között része a V-ATPáz valamint a Ras Related GTP Binding C (RRAGC) is. FL-ben mind a V-ATPáz egyes részeit kódoló *ATP6V1B2* és *ATP6AP1* gének, mind a *RRAGC* gén mutációit kimutatták. A mutációk fokozzák az mTORC1 aktivációt, illetve függetlenítik azt az aminosav ellátottságtól. Fontos továbbá, hogy a *RRAGC* mutáció gyakorisága nem változik a betegség folyamán, és funkciónyerő mutáció lévén felmerül az mTORC1-et gátló terápia lehetősége [35].

#### II.1.1.4.3 A B-sejt receptor útvonal komponenseinek mutációja FL-ben

A B-sejt receptor (BCR) jelátvitel szerepe meghatározó a centrum germinativum B-sejtekben, melyek az FL prekursor sejtjeinek tekinthetők. A BCR-ről induló jelátvitel több lépésen keresztül aktiválja az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort. A jelátviteli útvonal jelentőségét támasztja alá a betegség patogenezisében az, hogy az útvonalban részt vevő fehérjéket kódoló gének többségében szomatikus mutációk jelennek meg a follicularis lymphomában szenvedő betegekben. Leggyakrabban az *EPHA7* (70%), a *TNFAIP3/A20* (2-26%) és a *CARD11* (10-15%), valamint a *FOXO1* (5-10%) szenved mutációt [36, 37]. Terápiás szempontból kiemelendő, hogy a BCR útvonal is számos célozható komponenssel rendelkezik, melyek gátlószerei közül már több is a klinikai kipróbálás stádiumában van FL-ben [38, 39].

#### II.1.1.5 Az FL kezelése

Bár mára az FL teljes túlélése eléri a 15 évet, a betegséget továbbra is gyógyíthatatlannak tartjuk, amit főképp a betegségre jellemző relapszushajlam magyaráz. Az FL kezelése elsősorban a betegség stádiumától függ. A betegek stádiumának meghatározása az Ann Arbor stádiumbeosztás alapján történik. A terápiás stratégia, valamint a kezelési indikáció mérlegelése során a betegek 3 nagy csoportba oszthatók: a betegek kevesebb, mint 20%-ánál I. vagy II. stádiumú, limitált kiterjedésű betegség jelentkezik. Ezekben az esetekben az érintett nyirokcsomó régió 24 Gy dózisu besugárzása kuratív lehet, a sugárkezelést követően a 10 éves relapszus-mentes túlélés 45-60%, míg a 10 éves várható túlélés akár a 60-80%-ot is elérheti [40]. Kiterjedt III., valamint IV.-es stádiumú betegség, továbbá a 7 cm átmérőnél nagyobb bármilyen stádiumú, illetve besugárzással nem kezelhető tumorok esetén a kezelés indikációja



a GELF/BNLI csoportok általi beosztás alapján állapítható meg. Aszimptomatikus, nem nagy tumortömegű follicularis lymphoma esetében a „watch and wait”, avagy figyelő várakozás a választandó stratégia, mivel a korán megkezdett terápia sem a várható túlélést, sem a transzformáció megelőzését illetően nem bizonyult hatékonynak, és így a mellékhatások, valamint a gyógyszerelés költsége is elkerülhető [41]. Kiterjedt, tünetes betegség elsődleges kezelése esetén CD20 elleni antitest – elsősorban rituximab – alapú kombinációs kemoimmuno-terápia ajánlott, melyet rituximab fenntartó kezelés követ. A legjobb eredmények R-CHOP (rituximab-cyclophosphamid-doxorubicin-vincristin-prednisolon), valamint R-B (rituximab-bendamustin) kombinációval érhetők el.

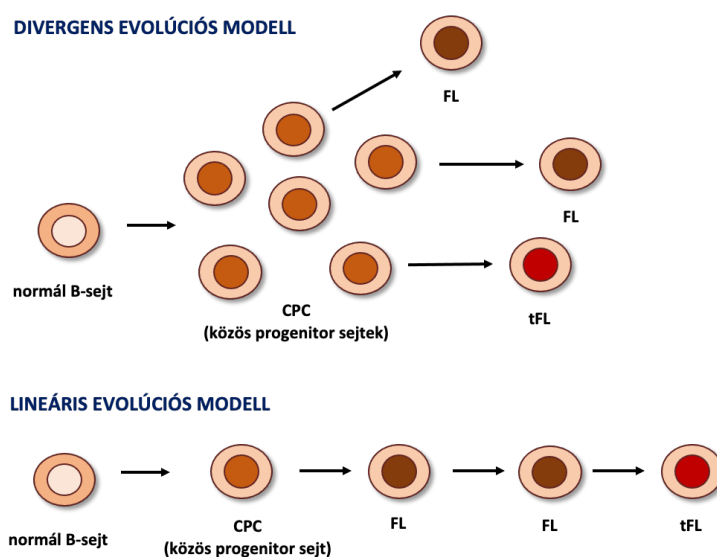
A relapszus kialakulása a betegség természetéből adódóan törvényszerű. Gyors progressziót vagy hároméves remissziót követően ajánlott az újbóli biopszia, és a szövettani vizsgálat megismétlése. Limitált kiterjedésű relapszus, valamint korábbi radioterápiás kezelés hiánya esetén sugárterápia, míg előrehaladott esetben a már ismertett kemoimmuno-terápiás kombinációk választása javallott. A többedvonalbeli kezelések hatékonysága jóval szerényebb, azonban számos új terápiás lehetőség áll a kezelőorvosok részére. A közelmúltban számos célzott terápiás, valamint biológiai terápiás készítménnyel folytattak vizsgálatot a relabáló/refrakter betegek kezelésére, melynek eredményeként mára törzskönyvezték többek között a PI3K gátló idelalisibet, copanlisibet és duvelisibet, valamint a CD20 elleni radioimmunterápiás antitest ibritumomab tiuxetant [12, 42, 43]. Kiemelendő a szelektív EZH2 gátlószer, a tazemetostat, amely klinikai tanulmányokban ígéretes eredményeket mutat az *EZH2* mutációt hordozó relabált FL betegek esetében (objektív válasz arány 71% az *EZH2* mutáns betegcsoportban szemben a 33%-os válaszaránnyal az *EZH2* vad típusú betegek között) [44]. Számos hiszton deacetiláz gátlószer is (például abexinostat, vorinostat) kipróbálás alatt áll különböző klinikai tanulmányokban [45, 46]. A klinikai vizsgálatok eredményének függvényében az új terápiás lehetőségek száma várhatóan tovább fog gyarapodni.

A IIIB grádusú, valamint a transzformált FL kezelése a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) terápiás protokollja alapján történik. Első vonalban a betegek R-CHOP kezelésben részesülnek, második vonalban pedig fiatal betegek esetén magas dózisú terápiát követően autológ hemopoetikus őssejt átültetés (HSCT) ajánlott [47]. Klinikai szempontból az FL magas grádusú transzformációja jelenti a legnagyobb kihívást az FL kezelésében.

### II.1.1.6 Az FL transzformációja

Évente az esetek mintegy 2-3%-ában kedvezőtlen prognózissal bíró transzformáció alakul ki, ami szövettanilag leggyakrabban diffúz nagy B-sejtes lymphomába (DLBCL) való átalakulásnak felel meg [48-50]. Szövettanilag a transzformáció során a follicularis struktúra eltűnik, és magas grádusú lymphomának, az esetek többségében DLBCL-nek megfelelő szövettani kép alakul ki. Klinikailag a gyors nyirokcsomó növekedés, a kiugróan magas LDH, az ECOG státusz gyors romlása, új „B” tünetek megjelenése, hipercalcemia, és extranodalis területekre való disszemináció jelezheti a transzformált FL (tFL) kialakulását, melynek gyanúja esetén minden esetben megerősítő szövettani vizsgálat javasolt. A tFL-t hagyományosan a *de novo* DLBCL-nél is rosszabb prognózisú betegségnek tekintették [50], azonban a rituximab-érában végzett vizsgálatok már hasonló túlélési adatokról számolnak be a két betegcsoport esetében [51]. Mára a magas grádusú betegek kevesebb mint 10%-át érinti, ugyanakkor a leggyakoribb haláloknak tekinthető FL-ben [52].

Az immunglobulin gének mutáció-analízise alapján tumor mikro-evolúciós szempontból feltételezzük, hogy az ún. FL közös progenitor sejtek (CPC) sejtek alkotják a betegség relapszusainak és transzformációjának rezervoárját [53]. A betegség progressziója és transzformációja kapcsán a lineáris vagy divergens evolúciós modellek vetélkednek egymással (7. ábra) [54]. Korábbi tanulmányok a *MYC* gén transzlokációját, valamint a *TP53* gén mutációit és kópiaszámváltozásait hozták összefüggésbe az FL transzformációjával [55, 56], azonban e kedvezőtlen kimenetelű folyamat hátterében álló genomi változások nagyfelbontású analízise munkacsoportunk ilyen irányú tanulmányának megjelenéséig váratott magára.



7. ábra: A follicularis lymphoma progressziójának és transzformációjának evolúciós modelljei.

## II.1.2 Krónikus lymphocytás leukémia (CLL)

A CLL a leggyakoribb felnőttkori leukémia a nyugati országokban, Magyarországon az éves incidenciája 3-5/100.000 lakos/év, amely a krónikus leukémiák 90%-át, míg az összes leukémia mintegy 25-30%-át teszi ki [1]. A CLL jellemzően az idős korosztály megbetegedése, a betegség manifesztációjakor a medián életkor 65-70 év, emellett férfi túlsúly jellemző rá. A sporadikus megjelenés mellett a CLL olykor családi halmozódást is mutat, a betegek 5-10%-ában a családi anamnézisben CLL, vagy egyéb lymphoproliferatív megbetegedés (non-Hodgkin-lymphoma, Hodgkin-kór) szerepel [57, 58]. A CLL-es páciensek első fokú rokonaiban a CLL kialakulásának valószínűsége 8,5%, ami a lymphomák között a legerősebb öröklődési hajlamnak számít [57].

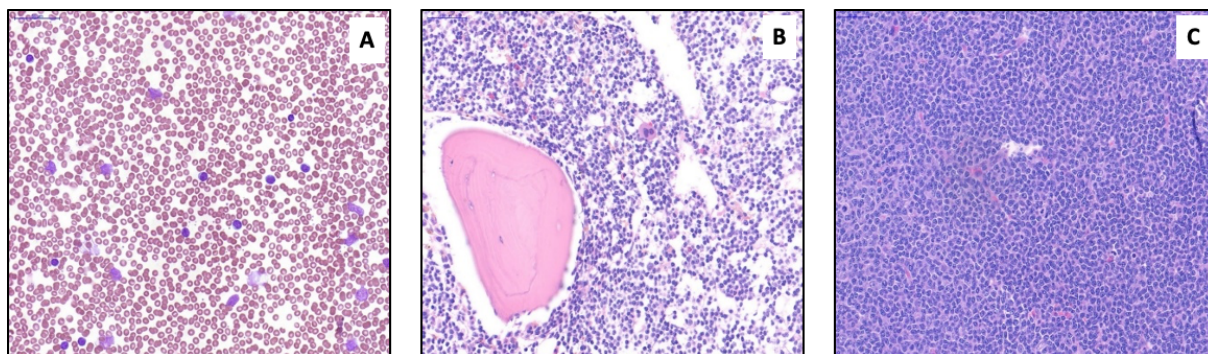
A kórképet heterogén klinikai megjelenés jellemzi, a betegek döntő többségében indolens, kezelést évekig nem igénylő kórlefelgyással. A betegek közel egyharmadában azonban agresszív lefolyás jelentkezik, melynek során gyors progresszió, rövid progresszió mentes túlélés, gyakori relapszusok jellemzőek, mindez terápiarezisztenciához vagy egy agresszívabb kórképbe (például diffúz nagy B-sejtes lymphomába Richter-szindróma esetén) történő transzformációhoz vezet [59]. Az agresszív lefolyású CLL-ben szenvedő betegek átlagos túlélése mindössze egy év [60].

### II.1.2.1 A CLL diagnózisa

A CLL tünetei a betegek többségében fokozatosan fejlődnek ki, a lymphocytosis és a nyirokcsomó megnagyobbodás a betegség korai stádiumában, míg a máj és a lép megnagyobbodása, valamint a B-tünetek (láz, éjszakai izzadás, fogyás) az előrehaladottabb stádiumokban jelennek meg.

A CLL diagnózisára és kezelésére három fő szervezet szakmai irányelve áll rendelkezésre: a nemzetközi CLL-munkacsoport (iwCLL: „International Workshop on CLL”), az Egyesült Államok irányadó szervezete (NCCN: „National Comprehensive Cancer Network”), illetve az európai onkológiai társaság (ESMO: „European Society of Medical Oncology”) [61-63]. Mindhárom irányelv megegyezik abban, hogy a CLL diagnosztikai kritériumai az  $5 \times 10^9/L$ -t ( $5000/\mu L$ ) meghaladó lymphocytaszám a perifériás vérben, illetve a keringő leukémiás B-sejtek áramlási citometriával igazolható klonalitása (4). A CLL többnyire egy indolens lefolyású kórkép, melyben érett, klonális B-sejtek (CD5+CD23+) szaporodnak fel a csontvelőben, a perifériás vérben és a lymphoid szervekben (8. ábra). Amennyiben egyébként

egészséges, tünetmentes emberek vérében a klonális B-lymphocytaszám abszolút emelkedése tapasztalható, mely nem haladja meg az  $5 \times 10^9/L$ -t, és nem kíséri lymphadenopathia, organomegália, cytopenia, betegséggel kapcsolatos tünetek, a diagnózis monoklonális B-sejtes lymphocytosis (MBL) lesz. Az elmúlt években fény derült arra, hogy az MBL szinte minden esetben megelőzi a manifeszt CLL kialakulását. Annak ellenére, hogy az MBL 40 év feletti lakosság 12%-ában előfordul, évente a betegek csupán 1-3%-ában progrediál CLL-be [64].



**8. ábra:** A krónikus lymphocytás leukémia morfológiája a **A:** perifériás vérben, **B:** a csontvelőben és **C:** a nyirokcsomóban. (Forrás: Marosvári és mtsai, Magyar Onkológia 2016)

#### II.1.2.2 A CLL prognózisa

A CLL-ben szenvedő betegek prognosztikai felmérésében a klinikai stádiumbeosztás (Rai, Binet) mellett kiemelt szerepe van a genetikai markerek alapján történő osztályozásnak is. Döhner és mtsai. 2000-ben egy citogenetikai aberrációkon alapuló prognosztikai modellt írtak le, melyben az egyes citogenetikai eltérések a progresszió és a túlélés szempontjából egymástól jól elkülönülő csoportokat definiáltak [59]. A teljes túlélés (OS: „overall survival”) szempontjából a 13q deléció bizonyult a legkedvezőbb kromoszómaaberrációnak, míg a normál karyotípus, a 12-es triszómia, a 11q deléció és végül a 17p deléció (del17p) egyre rövidebb túléléssel járt [59]. A 2016-ban létrehozott CLL nemzetközi prognosztikus index (CLL-IPI: „CLL International Prognostic Index) a citogenetikai eltéréseken túl a betegek klinikai (életkor, stádium), biokémiai (B2-mikroglobulin szint), valamint genetikai paramétereit is integrálja. Így a 17p régió deléciója mellett a CLL-IPI rendszerben kiemelt súllyal kapnak szerepet a *TP53* gén mutációi, valamint az immunglobulin nehézlánc gén V szegmensének (*IGHV*) mutációs státusza is [65]. Ismert, hogy a CLL diagnózisakor a betegek mintegy 5-10%-ában kimutatható *TP53* mutációk esetében a 17p deléciót hordozó betegekéhez hasonló kedvezőtlen kórlefolyás várható [66, 67]. A *TP53* defektust (17p deléció és/vagy *TP53* mutáció) hordozó betegeket hagyományos terápiás modalitásokkal kezelve alacsony válaszarányra és rövid túlélésre lehet

számítani [68]. Az *IGHV* gén mutációs státusza, amely a hipervariábilis régióban található szomatikus hipermutáció mértékétől függően ún. mutálatlan, vagy *IGHV* mutáció negatív (U: „unmutated”) és mutált, vagy *IGHV* mutáció pozitív (M: „mutated”) csoportokra bontható, szintén független prognosztikus biomarkere a betegségnek. Számos tanulmány bizonyította, többek között saját korábbi megfigyeléseink is [69], hogy az U-CLL betegek esetében kedvezőtlenebb kórlefolyás (többek között rövidebb teljes túlélés) várható [70], míg M-CLL esetében a betegek egy részében rendkívül hosszú remisszió érhető el a hagyományos terápiás modalitások alkalmazásával [71]. A *TP53* defektus és az *IGHV* mutációs státusz mára a később ismertetésre kerülő célzott terápiák indikációja kapcsán is központi szerepet tölt be [62].

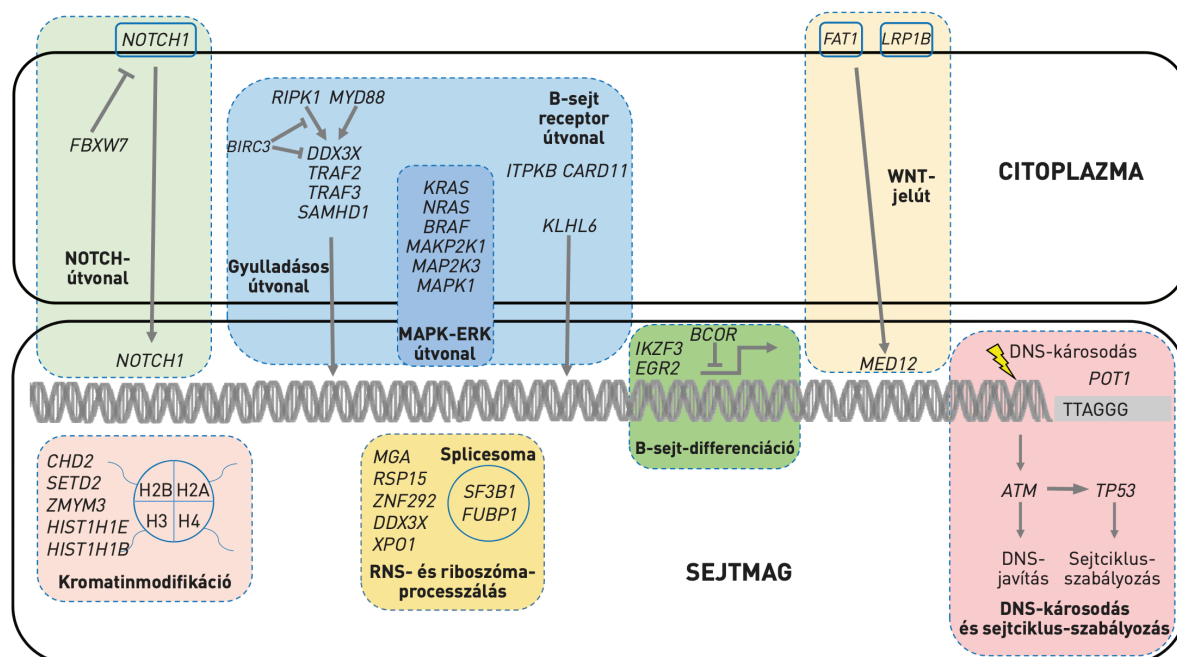
### *II.1.2.3 A CLL patogenezeise*

Bár a CLL patogenezisének és sejteredetének részletei ma még nem ismertek, a tudomány jelenlegi álláspontja szerint a legkorábbi CLL-hez vezető elváltozások már a pluripotens hemopoetikus őssejtekben létrejönnek, azok ugyanis xenotranszplantációt követően immundeficiens egerekben képesek MBL-hez hasonló klonális B-sejt szaporulatot létrehozni [72]. Ezt az elképzelést támasztják elő azok a megfigyelések is, melyek szerint, bizonyos CLL-re jellemző genetikai eltérések a CLL-es betegek HSC sejtjeiben is kimutathatók voltak [73, 74]. Ugyanakkor a manifest betegséghez vezető léziók időbeliségének, az érintett sejttípus (HSC vs. érett B-sejt), illetve a csíráközpontokban zajló immunológiai folyamatok relevanciájának tekintetében a CLL kialakulásának patomechanizmusa továbbra sem tisztázott.

### *II.1.2.4 A CLL genetikai háttere*

Az elmúlt évtizedben a teljes genom- és exomszekvenálások (WGS: „whole-genome sequencing, „WES: „whole-exome sequencing”), megjelenésével a CLL genetikai állománya feltérképezésre került. Mára több mint 1000 CLL-es beteg teljes genetikai szekvenciája áll rendelkezésünkre [75, 76]. Ezen tanulmányok eredményei alapján ismert, hogy a CLL mutációs rátája viszonylag alacsony, ún. csendes genommal rendelkezik (mindössze 0,9 mutáció/megabázis). A genom-szintű tanulmányok sem azonosítottak olyan CLL-re jellemző eltérést, amely az esetek több mint 15%-ában lenne jelen [77-81]. A mutációkat hordozó jelátviteli pályák (és érintett gének) vonatkozásában kiemelendők a B-sejt receptor útvonal (*BIRC3*, *RIPK1*, *MYD88*), a Notch jelátvitel (*NOTCH1*, *FBXW7*), a kromatinmodifikáció (*CHD2*, *ZMYM3*, *SETD2*), az RNS processzálas (*SF3B1*, *XPO*), a B-sejt differenciáció

(*BCOR*), valamint a DNS károsodás és a sejtciklus szabályozás (*ATM*, *TP53*, *POT1*) komponensei (9. ábra).



**9. ábra:** A krónikus lymphocytás leukémiában leggyakrabban érintett jelátviteli útvonalak és ezek mutációkat hordozó komponensei. (Forrás: Marosvári és mtsai, Magyar Onkológia 2016)

A CLL genetikai komplexitására és heterogenitására utal az is, hogy az említett gének közül alig néhány (*NOTCH1* (8–12%), *SF3B1* (9–11%), *TP53* (5–8%), *ATM* (5–7%)) mutációs gyakorisága éri el az 5%-ot a CLL-es betegpopulációban, valamint jelentős különbségek mutatkoznak a mutációs terhelés tekintetében az U-CLL és M-CLL betegek között is [76]. Érdekes módon a mutációkat hordozó gének egyben gyakran a jól ismert kromoszóma-elváltozások által érintett gének is, a *TP53* gén például a 17-es kromoszóma rövid karján (17p), míg a *BIRC3* és az *ATM* gének a 11-es kromoszóma hosszú karján (11q) találhatóak. Jelentős erőfeszítések zajlanak továbbá ezen újonnan azonosított mutációk klinikai jelentőségének feltárására és azok integrálására a rendelkezésre álló klinikogenetikai rizikóbecslő rendszerekbe [76, 82].

### II.1.2.5 A CLL kezelése

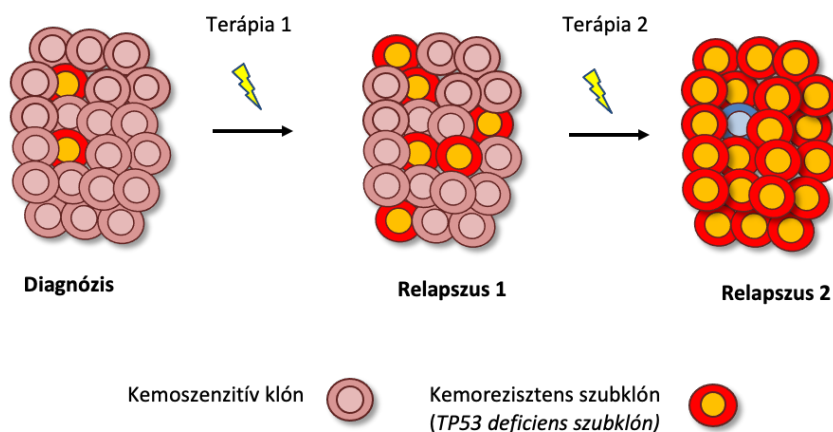
A kezelési indikációval rendelkező CLL-es betegeket a terápiás stratégia megválasztása előtt az általános állapot és kísérő betegségek alapján tradicionálisan három fő kategóriába sorolhatjuk [83]. A legjobb prognózisú, kis kockázatú csoportot az ún. „go-go” betegek képezik, akiknek általános állapota jó és túlélésük ideális esetben alig különbözik az azonos korú átlagpopulációtól. Ezen betegek elsővonalon agresszívan kezelhetők, amely lehetővé teszi a komplett remisszió (CR) elérését, így esetükben a progressziómentes túlélés (PFS) és az általános túlélés (OS) szignifikánsan meghosszabbítható. Az ún. „slow-go” betegcsoportba már a rosszabb általános állapotú, maximum két kísérőbetegséggel rendelkező, ezért közepes kockázatú betegek sorolhatók. Számukra kevésbé agresszív terápia javasolt, mellyel így többnyire csupán parciális remisszió (PR) érhető el. Ugyanakkor a később ismertetésre kerülő célzott terápiák megjelenése új távlatokat nyitott ezen betegcsoportban is. A harmadik csoportba a magas kockázatú, rossz általános állapotú, súlyos társbetegségekben szenvedő ún. „no-go” (ún. „frail”) betegek tartoznak. Ezeknél a betegeknél legfeljebb cytoreduktív kezelésre van lehetőség, a kísérő tünetek enyhítésére és az életminőség javítására szolgáló egyéb támogató terápiák kíséretében [83, 84].

Számos B-sejtes NHL-ához hasonlóan a CLL-es betegek kezelésében is áttörést hozott a monoklonális antitest rituximabnak hagyományos kemoterápiás ágensekkel való kombinációja (kemoimmuno-terápia). A rituximab hozzáadásával növelhető volt a korábbi terápiák hatékonysága, amit számos nemzetközi tanulmány igazolt [85, 86]. Az RFC (rituximab, fludarabin, ciklofoszfamid) terápia így 2009-ben az ún. „go-go” betegek első vonalbeli kezelésévé vált, és megnövekedett OS-sel áttörő sikert jelentett a CLL kezelésében. A sikerek ellenére az RFC terápia a betegek egy részében sajnálatos módon nem jelentett megoldást, a súlyos komorbiditásokkal bíró betegek és a 17p deléciót hordozó, tehát *TP53* deficiens betegek rosszul tolerálták a kemoimmuno-terápiát, előbbi betegcsoportban súlyos mellékhatások jelentkeztek, utóbbiban a PFS lerövidült, míg a CR szinte elérhetetlenné vált. A komorbid betegek számára így az alternatíva a kevésbé agresszív R-CLB (rituximab, chlorambucil) kombináció, míg a *TP53* defektust hordozó betegcsoport számára az allogén HSCT maradt. Az RFC korszakban több új kemo- és immunterápiás szer is megjelent a kezelési alternatívák között, a *TP53* deficiens betegcsoport számára azonban egészen 2014-ig várni kellett a nagy áttörésre. Az első generációs anti-CD20 monoklonális antitest sikerét a CD20 ellenes antitestek további generációi követték (ofatumumab, obinutuzumab), immáron nagyobb hatékonysággal, specifikusabb hatással és kevesebb mellékhatással [87].



### II.1.2.5.1 Terápia-indukált klonális evolúció CLL-ben

A genomszekvenálások segítségével az újonnan azonosított genetikai léziók mellett fény derült a CLL komplex genetikai és klinikai megjelenésének háttérében álló klonális evolúció folyamatára is, ami a betegek egy részében megjelenő agresszív lefolyás (gyors progresszió, terápiarezisztencia) pontosabb megértéséhez vezetett [88]. Továbbá, a klonális evolúció vizsgálata rávilágított az alacsony allélfrekvenciával jelenlévő, szubklonális mutációk jelentőségére is, melyek széleskörű és hatékony kimutatására csak az új-generációs szekvenálás (NGS) megjelenésével nyílt lehetőség [89]. A terapia-indukált klonális evolúció tűnik a hagyományos kemoimmuno-terápia kudarcának háttérében álló eseménysornak a *TP53* defektust hordozó betegek csoportjában is. A betegség kezdeti fázisaiban a különböző genetikai és epigenetikai eltéréseket hordozó sejtek alacsony allélfrekvenciával vannak jelen, miközben szelekciós hatás hiányában a heterogén szubklonális struktúra egyensúlyi állapotban van. Az alkalmazott genotoxikus terápiák szelekciós nyomásának köszönhetően a rátermettebb klónok – kihasználva szelekciós előnyüket – gyorsan dominánssá válnak, ezáltal terápiarezisztens betegséget alakítanak ki (10. ábra) [90].

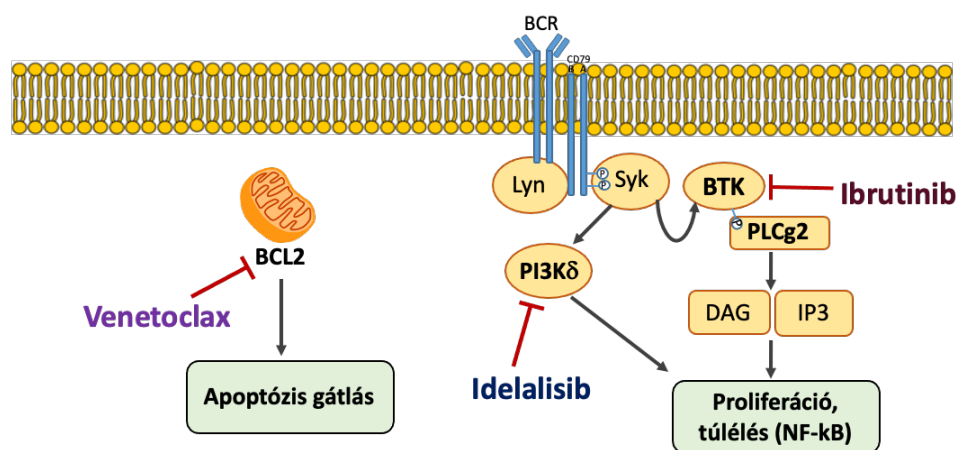


**10. ábra:** Terápia-indukált klonális evolúció krónikus lymphocytás leukémiában. A hagyományos kemoimmuno-terápia szelekciós nyomásának eredményeképpen a rátermettebb *TP53* deficiens klónok térnyerésének köszönhetően terápiarezisztens betegség alakul ki.



### II.1.2.5.2 Célzott terápiák CLL-ben

Az elmúlt években a CLL kezelésében is elérhetővé váltak különböző kis molekulájú célzott terápiás szerek, melyek hatásmechanizmus alapján két fő csoportra oszthatók. A B-sejt receptor (BCR) jelátvitelében résztvevő fehérjék gátlószerei a Bruton-féle tirozin-kináz (BTK) inhibitor ibrutinib és a foszfatidil-inozitol-3-kináz  $\delta$  (PI3K $\delta$ ) inhibitor idelalisib, illetve az antiapoptotikus B-sejtes lymphoma 2 (Bcl-2) fehérje gátlószere a venetoclax (11. ábra) [91]. Ezen új hatóanyagok – függetlenül a betegek *TP53* státuszától – a klinikai vizsgálatokban rendkívül eredményesnek bizonyultak a relabáló/terápiarezisztens CLL-es betegekben is, és mára a hazai CLL-es betegek kezelési protokolljainak is szerves részét képezik [92].



**11. ábra:** Célzott terápiás beavatkozási pontok krónikus lymphocytás leukémiában (CLL). Az elmúlt években az ibrutinib, az idelalisib és a venetoclax is megjelentek a CLL terápiás palettáján.

Az alábbiakban a később bemutatása kerülő eredmények szempontjából releváns ibrutinib rövid ismertetésére szorítkozunk.

### II.1.2.5.3 Ibrutinib terápia CLL-ben

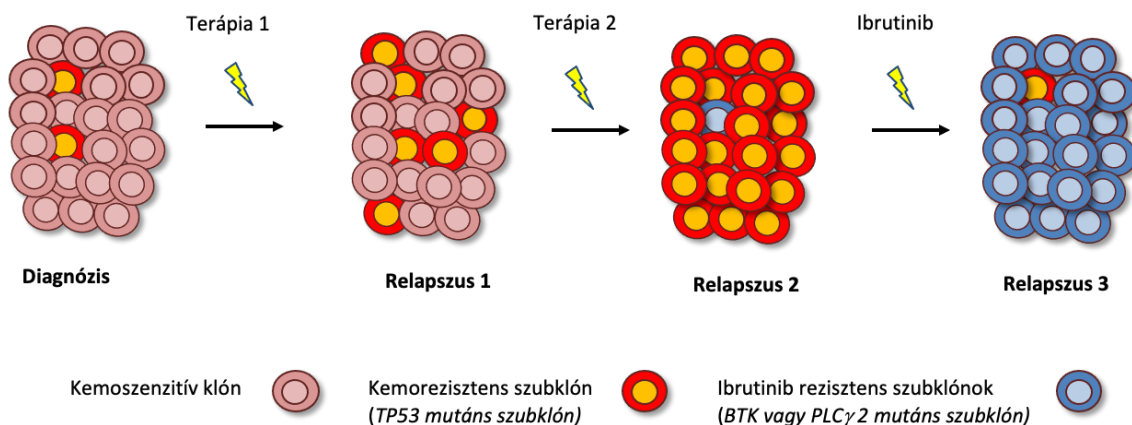
Az ibrutinib 2014-es bevezetése a többedvonalbeli kezeléssel is kudarcot valló, terápiarezisztens betegeknél korábban nem látott eredmények elérésével forradalmasította a refrakter/relabáló betegek kezelését. A gyógyszer hatásosnak bizonyult a magas rizikójú CLL-es (*TP53* defektust hordozó) betegek kezelésében is, akár 70–90%-os teljes válaszadási arányt (ORR: „overall response rate”) elérve elsővonalbeli alkalmazás során [93]. Napjainkra az ibrutinib a relabált CLL szinte standard terápiájává vált, és *TP53* defektus esetén elsővonalban is alkalmazható. Továbbá, néhány ajánlás már a fokozott BCR útvonal aktivitást mutató

mutáció-negatív IGHV-val (IGHV-U) rendelkező betegek elsővonalbeli kezeléseként javasolja az ibrutinibet [83].

Az ibrutinib kovalensen kötődik a BTK aktív centrumában elhelyezkedő 481-es pozíciójú ciszteinhez (C481), ezáltal irreverzibilisen meggátolja a BTK foszforilációját, és az onnan kiinduló jelátviteli útvonalak aktiválódását [94]. Ennek következtében a BCR-jelátvitel gátlódik, ami a B-sejtekben apoptózist indukál, valamint gátlás alá kerül a B-sejtek migrációja és a tumoros mikrokörnyezethez történő adhézioja is [95]. Továbbá, a BTK meghatározó szerepet játszik a B-sejtek keringésbeli szállításának és a szövetekbe történő hazatérésének (ún. homing) koordinálásában, különböző kemokin receptorok (CXCR4, CXCR5) és adhézio molekulák (integrinek) által mediált jelátviteli útvonalak szabályozásán keresztül [96]. Mindezek fényében érthető, hogy a BTK-gátlásával nem csak az aberránsan működő BCR eredetű aktiváló szignálok hatását lehet felfüggeszteni, hanem a leukémiás sejtek migrációja és homingja is gátolható, aminek köszönhetően a kezelés kezdeti fázisában a perifériás vérben átmeneti limfocitózis figyelhető meg [97].

#### *II.1.2.5.4 Ibrutinib rezisztencia kialakulása CLL-ben*

A rendkívül látványos sikerek ellenére az ibrutinib kezelésben részesülő betegek egy részében rezisztencia alakul ki, ami a kezdeti megfigyelések alapján kedvezőtlen klinikai lefolyással társul. A szekunder ibrutinib rezisztencia hátterében az esetek döntő többségében a *BTK* vagy az attól disztálisan elhelyezkedő *PLCG2* szomatikus mutációi állnak. A leggyakrabban megfigyelhető genetikai eltérés a *BTK* tirozin kináz doménjében elhelyezkedő 481-es cisztein szerinre történő cseréje (C481S), amely következtében csökken a gyógyszer BTK iránti affinitása. Ezzel szemben a *PLCG2* mutációk (*PLCG2* R665W, *PLCG2* L845F) jellemzően funkcionyerő mutációk, melyek BTK-tól független, konstitutívan aktív BCR jelátvitelt eredményeznek [98, 99]. A mutációk kialakulása minden bizonnyal a betegség progressziója közben történik, ugyanis a terápia megkezdése előtt még rendkívül érzékeny új-generációs szekvenálási módszerekkel sem sikerült eddig *BTK* vagy *PLCG2* mutációkat kimutatni (12. ábra). Ugyancsak érdekes megfigyelés, hogy ezek a mutációk alacsony allélfrekvenciával a klinikai relapszust megelőzően akár egy évvel is kimutathatók a betegek keringésében [100].



**12. ábra:** Ibrutinib hatására bekövetkező klonális evolúció folyamata. A klasszikus kemoimmuno-terápiával analóg módon, az ibrutinib terápia hatására is végbemegy a kezeléssel szemben rezisztens szubklónok szelekciója, amelyek az esetek többségében *BTK* vagy *PLCG2* mutációkat hordoznak.

A szekunder terápia rezisztencia létrejöhet hisztológiai transzformáció útján (pl. Richter-transzformáció) is, mely jellemzően a kezelés korai fázisaiban (<15 hónap) alakul ki, és *BTK/PLCG2* mutációkkal kísérve, de azok megjelenésétől függetlenül is manifesztálódhat [101].

Terjedelmi megfontolások miatt a részletes kifejtéstől eltekintünk, de megemlítendő, hogy az ibrutinib kudarcot követően sikeresen alkalmazható a BCL2 antagonistá venetoclax, de hamarosan elérhetővé válnak további, akár a rezisztencia mutációk jelenlétében is hatásos alternatív BTK gátlószerek is [102, 103].

A kezdeti eredmények egyértelműen alátámasztották azt az elképzelést, hogy a klonális szelekció az ibrutinib szelekciós nyomásának hatására is folytatódik, mindazonáltal a *BTK/PLCG2* mutációk gyakorisága, azok szubklonális dinamikája és az ibrutinib kezelés hatására kialakuló szubklonális evolúció mintázata a CLL ismert mutációs célpontjainak vonatkozásában később bemutatásra kerülő tanulmányainkat megelőzően ismeretlen volt.

## II.2 Myeloid malignitások

A myeloid rendszer daganatos megbetegedései változatos genetikai háttérrel rendelkező entitások, melyek az érintett sejtvonalak számától függően heterogén klinikai tünetekkel járnak [7]. A betegségek molekuláris patomechanizmusa az érintett gének széles spektruma és az elvégzett vizsgálatok korlátozott száma miatt gyakran tisztázatlan marad, azonban egyre több esetben derül fény családi halmozódást mutató genetikai léziók jelenlétére is [104]. Bár a megbetegedések nagyobb hányada sporadikusan fordul elő, a ritka familiáris esetek az öröklődő genetikai eltérés monitorozásának köszönhetően ideális modellbetegségként szolgálnak a leukemogenesis molekuláris hátterének részletes feltérképezéséhez.

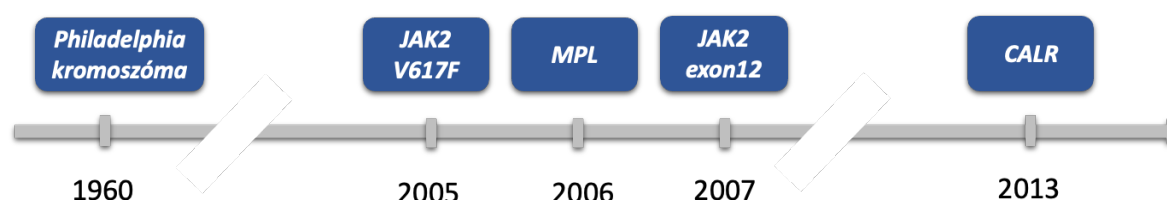
Az akut myeloid leukémia (AML) a myeloid rendszer daganatos megbetegedése, amely a csontvelői előalakok érésgátlása következtében jön létre [105]. Az AML igen heveny lefolyású betegség, mely az agresszív kemoterápiás protokollok ellenére is rossz prognózissal társul, egyetlen kuratív kezelési módja a remisszióban elvégzett HSCT. A sporadikus AML-ben leírt visszatérő genetikai abnormalitások nem fednek át teljes mértékben a familiáris esetekben megfigyelhető aberrációk repertoárjával, amely felhívja a figyelmet az AML-en belüli eltérő patomechanizmusok és biológiai útvonalak szerepére [106].

A myelodysplasiás szindróma (MDS) igen változatos klinikai manifestációval járó myeloid kórkép, amely az érintett sejtvonalak számától függően változó mértékű cytopeniával társul. Az AML/MDS-ben előforduló genetikai léziók egymással nagy átfedést mutatnak, amely egyúttal magyarázatul szolgálhat a két entitásban megjelenő hasonló kísérő tünetekre és az MDS-es esetek mintegy harmadánál bekövetkező AML-be történő transzformációra [7]. Bár az esetek túlnyomó része az AML-hez hasonlóan hereditár genetikai eltérés nélkül, sporadikusan alakul ki, az MDS volt az első myeloid rendszert érintő malignitás, amelyben a betegségre hajlamosító germline genetikai eltérést írtak le, valamint szintén a kórképben jelent meg először önálló entitásként a germline genetikai eltérést hordozó MDS alcsoport [107].

A myeloid kórképek harmadik nagy csoportja a myeloproliferatív neopláziák (MPN), melyekre általánosan jellemző a csontvelői myeloid előalakok fokozott termelődése és a változatos számú sejtvonalat érintő cytozis. A Philadelphia kromoszóma (Ph) jelenlétével definiált krónikus myeloid leukémia (CML) mellett a betegségcsoport fontos entitásai az ún. Ph- klasszikus MPN-ák, a polycythaemia vera (PV), az esszenciális thrombocythaemia (ET), és primer myelofibrózis (PMF), amelyek jellemzője a folyamatos JAK-/STAT aktiváció okozta fokozott sejtproliferáció [108]. Az értekezés szempontjából releváns Ph<sup>-</sup> MPN entitások (ET és PMF) bemutatására a II.2.3 fejezetben kerül sor.

## II.2.1 Myeloproliferatív neopláziák

A Philadelphia-kromoszómát nem hordozó (ún. Philadelphia kromoszóma negatív: Ph-) krónikus myeloproliferatív neopláziák (MPN) hemopoetikus őssejt eredetű neoplasztikus betegségek, amelyekre egy vagy több sejtsoron kiértékelt funkcionáló sejtek szaporulata mellett fokozott trombózis-rizikó és leukémiás transzformáció kockázata jellemző. A klasszikus Ph-MPN-ák közé a polycythaemia verát, az esszenciális thrombocythaemiát és a primer myelofibrózist soroljuk, amely kórképek háttérében álló mutációkat 2005 és 2013 között azonosították (13. ábra). A Janus-2 kináz (*JAK2*), Calreticulin (*CALR*) és thrombopoetin receptor (*MPL*) mutációk kimutatása mára a betegségcsoport diagnosztikájának meghatározó elemévé vált, egy molekuláris alapokon nyugvó betegségcsoportot eredményezve [108].

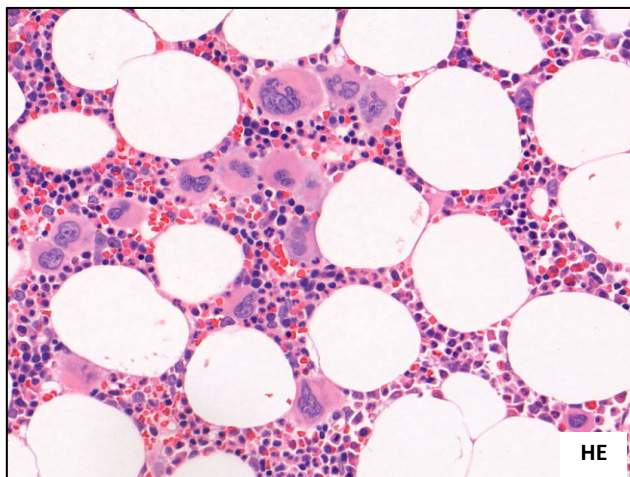


**13. ábra:** A myeloproliferatív neopláziák (MPN) driver genetikai eltéréseinek felfedezése. A krónikus myeloid leukémiát definiáló Philadelphia (Ph) kromoszóma felfedezését követte a kétezres években a *JAK2*, az *MPL* és a *Calreticulin* gének mutációinak felfedezése a Ph kromoszóma negatív MPN-ákban.

### II.2.1.1 Esszenciális thrombocythaemia (ET)

Az esszenciális thrombocythaemia trilineáris proliferációval, de főképp a megakaryocita sejtvonal érintettségével, perifériás thrombocytosissal és leukocytosissal járó myeloproliferatív megbetegedés, amelyre a perifériás vérben tartósan emelkedett thrombocytaszám ( $> 450 \text{ G/l}$ ), míg a csontvelőben érett megakaryocyták előfordulása jellemző [107]. A csontvelői kép döntően normocelluláris, jellegzetesek a diffúzan elhelyezkedő, klaszterekben rendezett, érett megakaryocyták, melyek nagy méretbeli változatosságot mutatnak (14. ábra).

A betegség incidenciája 0,2-2 beteg/100 000 fő, a betegek diagnóziskori átlag életkora megközelítőleg 50-60 év [107]. A defektív thrombopoézis következtében thrombotikus és vérzéses szövődmények, mikrocirkulációs zavarok, pruritus jellemzik a kórképet. Az ET egy indolens megbetegedésnek tekinthető, a medián túlélés eléri a 20 évet. A betegség ritkán progrediálhat myelofibrózisba, azonban az akut leukémiába való blasztos transzformáció extrém ritka [109].



**14. ábra:** Az esszenciális thrombocythaemia csontvelői képe. A csontvelő közel normocelluláris képet mutat, emelkedett megakaryocytá számmal. (Hematoxylin eozin festés, 20x)

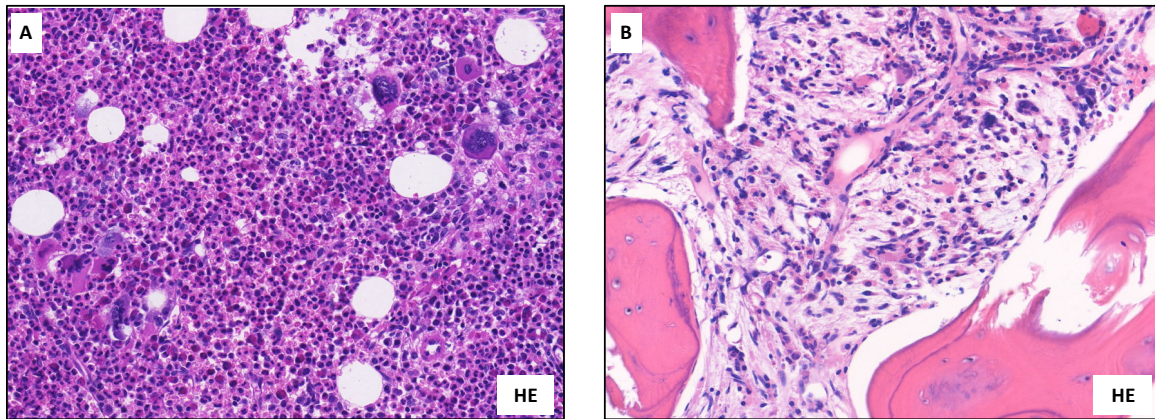
Az ET-ben szenvedő betegek kezelésének alapja az alacsony dózisú aspirin terápia, mely elsősorban az artériás trombózis valószínűségét csökkenti, de mindemellett kis mértékben a vénás trombózisok megelőzését is segíti. Ezen kívül cytoreduktív terápia, például hydroxyurea kezelés segítheti a betegek trombózismentes túlélését [110].

Genetikai háttérét tekintve az ET esetek mintegy 50-60%-ában kimutatható *JAK2* V617F mutáció, megközelítőleg 30%-ában *CALR* mutáció és mintegy 3%-ában *MPL* mutáció figyelhető meg. Az említett driver mutációkra negatív 10-15%-nyi betegcsoportot ún. tripla-vad genotípusú betegséggént definiáljuk [111, 112].

#### *II.2.1.2 Primer myelofibrózis (PMF)*

A primer myelofibrózist (PMF) a megakaryopoetikus és granulopoetikus sejtvonal hiperpláziája jellemzi, mely csontvelői fibrózissal, oszteoszklerózissal, abnormális citokin expresszióval, angiogenezissel és extramedulláris vérképzéssel társulhat. A progresszív lefolyású betegség a korai/prefibrotikus fázissal kezdődik, amit a manifeszt fibrotikus stádium követ. A prefibrotikus stádiumban sejtdús csontvelői kép figyelhető meg kétvonalas hiperpláziával, melyet az eritrocitózis relatív háttérbe szorulása kísér. A betegség progressziójával a vérképzősejtek száma csökken, a csontvelő fibrotikussá és acellulárisává válik (15. ábra). A vérképző elemek a csontvelőn kívül is megtelepednek, aminek köszönhetően kialakul az extramedulláris vérképzés [107].





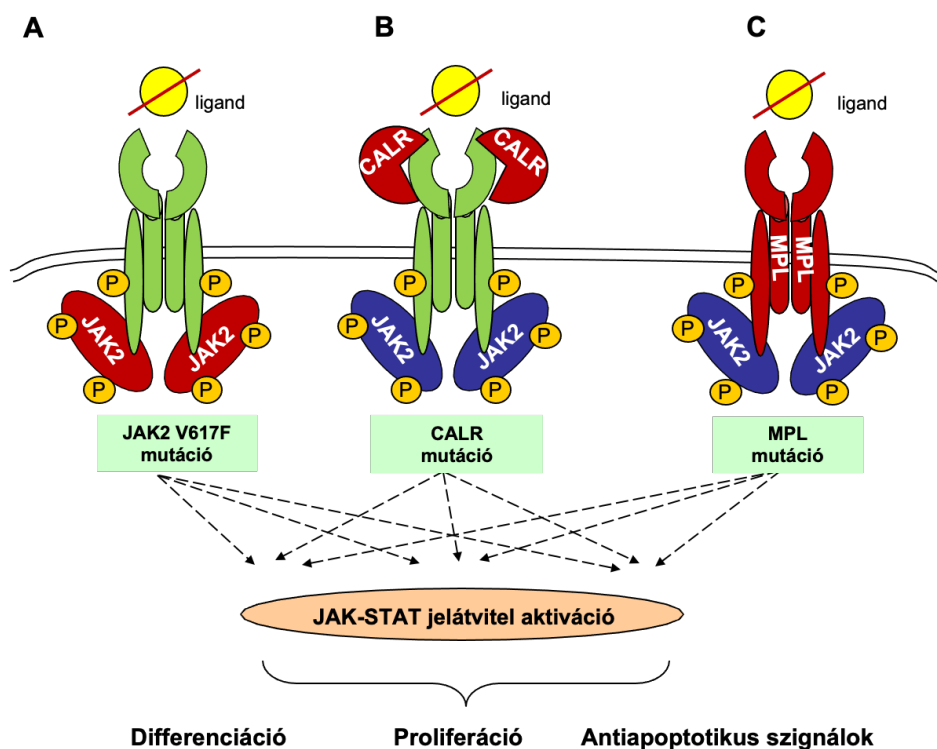
**15. ábra:** A primer myelofibrózis csontvelői képe. **A:** A prefibrotikus stádiumban a granulopoetikus és megakaryocyta vonalakat érintő kétvonalas hiperplázia látható, míg a **B:** manifeszt fibrotikus szakaszban csökkent cellularitás és fibrózis valamint oszteoszklerózis kialakulása látható.

A PMF előfordulási gyakorisága 0,5-1,5 eset százezer főre vetítve, és jellemzően a 6.-7. évtizedben jelenik meg. A betegség várható 10 éves túlélése a rizikóbesorolástól függően széles skálán (13-92%) mozog, a leggyakoribb haláloknak a leukémiás transzformáció és a cytopéniák következtében kialakuló infekciókkal szembeni fogékonyság tekinthető [113].

A PMF kezelésének az alapja a szteroidterápia az anémia mérséklésére, valamint a hydroxyurea kezelés a splenomegália mértékének csökkentésére. Magas rizikójú és terápiaerezisztens esetben allogén HSCT és célzott terápiaként a JAK2 inhibitor kezelés is elérhető a PMF-ben szenvedő betegek számára [113, 114].

#### *II.2.1.3 Driver mutációk jelentősége*

A *JAK2* V617, az *MPL*, majd végül a *CALR* mutációk felfedezésével az elmúlt két évtizedben megismertük a Ph- MPN-ák genetikai hátterét. A felsorolt gének mutációi a betegségcsoport úgynevezett fenotípus meghatározó driver mutációinak bizonyultak, mivel patogenetikai szerepük van ezen entitások kialakulásában [108]. Érdekes módon, mindhárom gén mutációi fokozott JAK-STAT útvonal aktivitáshoz vezetnek, ami magyarázatul szolgál arra, hogy különböző gének mutációi miképp vezethetnek egyazon kórkép kialakulásához (16. ábra). A mutáns géntermékek dózisa és az úgynevezett fenotípus módosító mutációk jelenléte nyújthat magyarázatot arra, hogy egy adott gén mutációja miképp vezethet többféle kórkép kialakulásához (például *CALR* mutációk ET és PMF esetében is patogén szereppel bírnak) [5, 108, 111].



**16. ábra:** A **A:** *JAK2* V617F, **B:** Calreticulin és **C:** Thrombopoetin receptor (*MPL*) mutációk szerepe a Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziákban. Mindhárom gén mutációi ligand-kötődéstől független módon kialakuló konstitutív JAK-STAT jelátvitel mediálásán keresztül fejtik ki patogén hatásukat.

#### II.2.1.3.1 *JAK2* V617F mutáció

A Janus-2 kináz (*JAK2*) 617-es pozícióban lévő valinjának lizinre történő mutációját (V617F) 2005-ben fedezték fel, ami a Ph- MPN-ák genetikai feltérképezésének első jelentős lépését jelentette [115-118]. A *JAK2* non-receptor tirozin kinázként az eritropoetin receptor (EPO-R), a thrombopoetin-receptor (MPL), valamint a granulocita-kolóniasztimuláló faktor receptorból (G-CSF-R) érkező szignálokat is képes továbbítani és szignáltranszdukciót aktiválni. A PV esetek mintegy 98%-ában, az ET és PMF esetek 55-65%-ában kimutatható V617F mutáció a fehérje JH2 doménjét érinti, aminek következtében a tirozin kináz funkció autoregulációs képessége károsodik, ami ligand hiányában is konstitutív JAK-STAT jelátvitel aktivációt, majd következményes sejtproliferációt eredményez.



### II.2.1.3.2 *MPL* mutációk

A trombopoetin-receptort a myeloproliferatív leukémia vírus (*MPL*) onkogén kódolja. Fiziológias körülmények között a receptort a trombopoetin aktiválja, a szignáltranszdukció pedig a JAK-STAT útvonalon keresztül történik [119]. Az *MPL* gén mutációiról először 2006-ban számoltak be ET-ben és PMF-ben [120, 121]. A mutációk többsége a 10-es exonban található, a 505-ös vagy 515-ös pozícióban lévő aminosavakat érinti, amelyek a receptor membrán közeli doménjének felépítésében vesznek részt [122]. A *JAK2*-t érintő mutációkkal analóg módon az *MPL* mutációk következtében ligand hiányában is konstitutív JAK-STAT aktiváció alakul ki, ami abnormális megakaryocyták megjelenéséhez vezethet. Az *MPL* mutációk az ET esetek 1-3%-ában, míg a PMF betegek mintegy 3-5%-ában fordulnak elő [120].

### II.2.1.3.3 *Calreticulin* mutációk

Az ET és PMF patogenezisében driver szerepet betöltő ezidáig utolsó azonosított eltérésekről a Calreticulin (*CALR*)  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis szabályozásában fontos chaperon fehérjét kódoló génben számoltak be 2013-ban [123, 124]. Mára több, mint 60 különböző *CALR* mutációt azonosítottak, amelyek mindegyike a gén 9-es exonját érinti [125, 126]. A mutációk döntően leolvasási keret-eltolódással járó inzerciók vagy deléciók, és általában heterozigóta formában jelennek meg. Kiemelendő az úgynevezett 1-es típusú (ún. „type 1”) mutáció, amely egy 52 bázispárnyi szakasz deléciójával jár (c.1092\_1143del), és a 2-es típusú (ún. „type 2”) *CALR* mutáció, amely egy 5 bázispárnyi szakasz inzercióját eredményezi (c.1154\_1155insTTGTC). Az 1-es és 2-es típusú mutációk teszik ki a *CALR* variánsok mintegy 65-75%-át. A további *CALR* mutációkat 1-es típus-szerű, 2-es típus-szerű és egyéb csoportokba sorolják [127, 128].

A mutációk a fehérje C-terminálisán található lyzin-aszparaginsav-glutamát-leucin (KDEL) retenciós szignált érintik, aminek következtében a mutáns CALR fehérje a vad típusúnál pozitívabb töltésűvé válik, ami a CALR fehérjét az endoplazmatikus reticulumban tartó retenciós szignál elvesztését eredményezi. Ez a jelenség is hozzájárul ahhoz, hogy a mutáns CALR fehérje képes az *MPL* extracelluláris doménjéhez kötődni (16.B ábra) és ezáltal a *JAK2* és *MPL* mutációkkal analóg módon, konstitutív JAK-STAT szignáltranszdukció által onkogén hatását kifejteni [129].

A *CALR* mutációk a *JAK2* és *MPL* negatív ET és PMF esetek 70-75%-ában kerültek azonosításra, a teljes ET/PMF populáció mintegy harmadában mutathatók ki [123, 124].

Az imént ismertetett driver mutációk DNS-szintű vizsgálata ma már a mindennapi onkohematológiai diagnosztikus algoritmusok részét képezi. Az utóbbi években megfigyelhető különböző driver mutációk fehérje-szintű, immunhisztokémiai kimutatását célzó eljárások megjelenése. A Ph- MPN-ák esetében ilyen jellegű próbálkozásról számoltak be Stein és mtsai., akik a CAL2 antitest alkalmazásával magas specifitással voltak képesek kimutatni a *CALR* mutációkat [130]. Ugyanakkor ezen megfigyelések csak alacsony esetszámmal és limitált számú mutációtípus esetén kerültek megerősítésre [131-133].

#### *II.2.1.4 Driver mutációk klinikai jelentősége ET-ben és PMF-ben*

A *JAK2*, *MPL* és *CALR* mutációk felfedezését követően a kutatók figyelme ezen driver mutációk klinikai jelentőségének megismerése felé fordult. Számos tanulmány vizsgálta a driver mutáció típusának hatását a betegség fenotípusára és klinikai lefolyására [134-136]. Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül ismertetésre kerül néhány ilyen jellegű összefüggés.

Általánosságban elmondható, hogy a *CALR* mutáció megjelenése kedvezőbb klinikummal társul ET-ben és PMF-ben egyaránt. A túlélés tekintetében a PMF esetében a *CALR*-mutációval rendelkező betegek életkilátásai a legkedvezőbbek (17,7 év medián túlélés), szemben az intermedier prognózisú *JAK2* és *MPL* mutációkat hordozó csoporttal (9,2 és 9,1 év medián túlélés) és a legkedvezőtlenebb a tripla vad genotípusú csoport medián 3,2 éves túlélésével [123, 124]. Érdekes módon, ET-ben a tripla vad genotípusú csoport esetében figyelték meg a leghosszabb túlélést, míg a driver mutációt hordozó betegek között ET-ben is a *CALR* mutáció jelenléte bizonyult kedvező prognosztikus tényezőnek a túlélés szempontjából [137]. ET-ben a myelofibrotikus transzformáció rizikóját vizsgálva a legmagasabb transzformációs rátát az *MPL* mutáció esetében írták le, míg a legkisebb transzformációs gyakoriságot *CALR* mutáció és a tripla vad genotípus esetében figyelték meg [137, 138].

A túlélési adatokon túl a driver mutációk típusa összefüggést mutat különböző klinikai és laboratóriumi paraméterekkel is ET és PMF esetén is. A *CALR* mutációt hordozó ET-ben szenvedő betegek általában fiatalabbak a *JAK2* mutáns betegekkel összehasonlítva, valamint alacsonyabb fehérvérsejtszámmal és hemoglobinszinttel rendelkeznek. Érdekes megfigyelés, hogy bár magasabb thrombocyta-számmal rendelkeznek, paradox módon a thrombózis-rizikó alacsonyabb ebben a betegcsoportban [123, 139, 140]. PMF-ben a *CALR* mutáns betegek általában alacsonyabb fehérvérsejtszámmal és magasabb thrombocyta-számmal bírnak a *JAK2* mutációval rendelkező betegekhez képest [141].

A *CALR* mutációk esetében a mutáció típusa is hatással van a betegség lefolyására: a fentebb ismertetett kedvezőbb klinikai megjelenés (hosszabb túlélés, magasabb hemoglobinszint, alacsonyabb fehérvérsejt-szám) az 1-es típusú (és az 1-es típus-szerű) *CALR* mutációk esetében kiemeltebben érvényesül [142], a 2-es típusú (és 2-es típus-szerű) mutációk kedvezőtlenebb betegséglefolyással társulnak [143]. Ismert továbbá, hogy az a 1-es típusú *CALR* mutációt hordozó betegek általában fiatalabbak, mint a 2-es típusú mutációval rendelkező betegtársaik [127].

#### *II.2.1.5 Driver mutációk mennyiségi meghatározása*

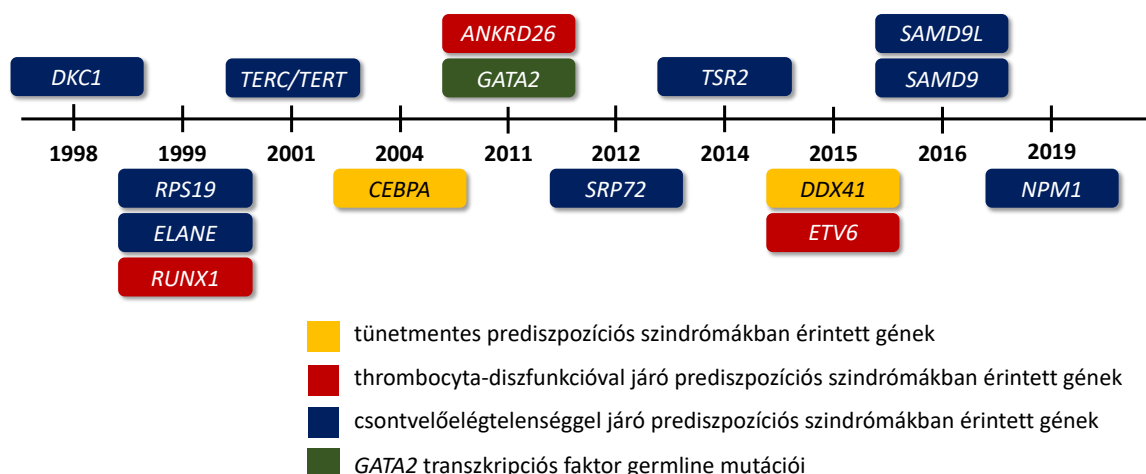
Az utóbbi években előtérbe került a mutációk mennyiségi meghatározásának jelentősége. Több tanulmány eredményei is arra utalnak, hogy *JAK2* és *CALR* mutációk esetében az úgynevezett mutációs allélterhelés (vagy variáns allélfrekvencia: VAF) mértéke, amely a malignus klón méretére utal, összefüggést mutat a betegek túlélésével és a klinikai lefolyást befolyásoló számos egyéb paraméterrel ET-ben és PMF-ben. A mennyiségi kimutatáshoz szükséges szenzitív technológiák alkalmazásának a betegség korai stádiumában is jelentősége lehet, hiszen típusos klinikum vagy morfológia hiányában akár egy kezdeti fázisban lévő betegség diagnózisának felállításában is segíthet a driver mutáció korai kimutatása. Továbbá, a mutáns alléltömeg meghatározása a betegség kockázatbecslése és nyomonkövetése szempontjából is jelentőséggel bírhat [144].

A *JAK2* V617F mutáció mennyiségi viszonyaival kapcsolatban több munkacsoport megfigyelései is rendelkezésünkre állnak már. Több tanulmány utal arra, hogy a *JAK2* V617F mutáns alléltömeg hatással van a kialakult betegség fenotípusára [134, 136, 145]. Magas *JAK2* V617F alléltömeg esetén PV, alacsonyabb alléltömeg esetén PMF, míg a legalacsonyabb *JAK2* V617F alléltömeg esetén ET kialakulása a legjellemzőbb [108]. A *JAK2* mutáns allélgyakoriságot több klinikai paraméterrel is összefüggésbe hozták: többek között a progresszívebb kórlefolyással [146] és a csontvelői fibrózis mértékével PMF-ben [147], valamint fokozott trombózis rizikóval ET-ben [148].

A *CALR* mutációk alléltömegének klinikumra gyakorolt hatásáról ET-ben és PMF-ben mindössze néhány tanulmány eredményei ismertek. Ismert, hogy a ET-re alacsonyabb *CALR* VAF jellemző, mint a PMF-re [149-152]. Ugyanakkor a *CALR* mutációs terhelés összefüggéseit különböző klinikai paraméterekkel ezidáig alig vizsgálták, a gén- és/vagy fehérje szintű *CALR* mutáns allélterhelés hatása az ET-ben és PMF-ben szenvedő betegek klinikopatológiai paramétereire még nem teljesen feltárt.

## II.2.2 Familiáris myeloid megbetegedések

A hematológiai malignitások családon belüli halmozódása régóta ismert jelenség, azonban az esetek genetikai hátterének feltérképezése csak az elmúlt évtizedben indult meg. A familiáris kórképek hátterében álló csíravonalbeli genetikai eltérések és az érintett gének leírásának kronológiai sorrendje a 17. ábrán látható.



**17. ábra:** A myeloid daganatok kialakulásához vezető predispozíciós szindrómákban azonosított germline eltérések által érintett gének felfedezésük sorrendjében. (Forrás: Kotmayer és mtsai, Magyar Onkológia 2020)

A myeloid rendszer familiáris megbetegedéseiben leírt gének száma a genetikai vizsgálati módszerek dinamikus fejlődésének köszönhetően az elmúlt években jelentősen megugrott, így a korábban irodalmi ritkaságnak vélt, de a közelmúltbeli vizsgálatokkal felismert familiáris entitások gyakorisága folyamatosan növekszik. Mindazonáltal számos ilyen mutációs célpont vizsgálata jelenleg még nem része a rutin diagnosztikai eljárásoknak, ezért feltételezhetően továbbra is jelentősen alábecsüljük a germline hajlamosító tényezők előfordulását, így az ezeket hordozó betegek követése és kezelése a sporadikus eltérés talaján kialakuló betegség terápiás protokollja alapján történik.

A nagyszámú leírt eltérés a familiáris myeloid kórképek osztályozását is jelentősen befolyásolta. A jelenlegi WHO-klasszifikáció már a klinikai tünetek és molekuláris eltérések együttesén alapszik, létrehozva a myeloid rendszer megbetegedésein belül egy új kategóriát: myeloid neopláziák germline hajlamosító tényezővel [107]. A csoportba tartozó entitások részletes osztályozása a 2. táblázatban kerül bemutatásra.

**2. táblázat:** Myeloid neopláziák germline hajlamosító tényezővel (WHO osztályozás alapján)

WHO-osztályozás (2016)	Predispozíciós szindróma	Érintett gének	Öröklés-menet	Klinikai tünetek
Predispozíciós szindróma előzetes és szervi diszfunkció nélkül	<i>DDX41</i> -érintettség	<i>DDX41</i>	AD	Idősebb korban (>50 év) megjelenő hematológiai malignitás
Predispozíciós szindrómák előzetes thrombocyta-diszfunkcióval	<i>RUNX1</i> -érintettség	<i>RUNX1</i>	AD	Enyhe/közepes fokú thrombocytopenia, thrombocyta-diszfunkció, vérzékenység
	Thrombocytopenia 2	<i>ANKRD26</i>	AD	Enyhe thrombocytopenia macrocytosis nélkül, thrombocyta-diszfunkció, vérzékenység
	Thrombocytopenia 5	<i>ETV6</i>	AD	Thrombocytopenia, thrombocyta-diszfunkció, vérzékenység
Predispozíciós szindrómák előzetes szervi diszfunkcióval	<i>GATA2</i> -érintettség	<i>GATA2</i>	AD	MonoMac-szindróma, Emberger-szindróma, immundeficienciák, csontvelőelégtelenség, neutropenia, monocytopenia, lymphoedema, atípusos infekciók
	Fanconi-anaemia*	<i>FANC</i> -géncsalád		Csontvelőelégtelenség, változó számú sejtvonalat érintő cytopenia, café au lait foltok, hypogonadismus, alacsony termet, csontdeformitások (arc, radius), sükettség, congenitális szív és vese rendellenességek, szolid tumorok
	Diamond–Blackfan-anaemia*	<i>GATA1</i>	X	Macrocyter anaemia, reticulocytopenia, csontvelőelégtelenség, csontdeformitások, szív és vese rendellenességek, alacsony termet, eADA szérumszint-emelkedés
		<i>RPL</i> -géncsalád		
		<i>RPS</i> -géncsalád		
		<i>TSR2</i>	X	
	Shwachman–Diamond-szindróma*	<i>SBDS</i> , <i>DNAJC21</i> , <i>EFL1</i>	AR	Izolált neutropenia, exokrin pancreasszekréció zavarai, csontvelőelégtelenség, alacsony termet, csontdeformitások, congenitális anomáliák
	Dyskeratosis congenita/Telomere biology disorder	<i>DKC1</i>	X	Csontvelőelégtelenség, körömdisztrófia, bőr pigmentációs zavarai, orális leukoplakia, immundeficiencia, vaszkuláris rendellenességek, congenitális anomáliák, rövid telomerhossz
		<i>TERC</i>	AD	
		<i>TERT</i>	AD, AR	

Rövidítések: AD = autoszomális domináns öröklésmenet; AR = autoszomális recesszív öröklésmenet; X = X-kromoszómához kapcsolt öröklésmenet; \* A predispozíciós szindróma a csontvelőelégtelenséghez vezető szindrómák (BMF: „bone marrow failure”) csoportjába tartozik.

A genetikai eltérés és szervi érintettség alapján a germline genetikai predispozíciót hordozó esetek 3 fő csoportja különböztethető meg [7]. A *CEBPA* és *DDX41* gének germline mutációi által létrehozott AML/MDS előzetes tünet és szervi diszfunkció nélkül alakul ki, ezért a preklinikai stádiumban rendszerint nem kerül felismerésre. A manifest AML/MDS-t megelőzően thrombocyta-diszfunkcióval járó predispozíciós szindrómák esetében sok esetben azonosíthatók a *RUNX1*, *ANKRD26* és *ETV6* gének mutációi, míg az előzetes szervi diszfunkció hátterében leggyakrabban a *GATA2* és *TERC/TERT* gének érintettsége igazolódik [153]. A továbbiakban az egyes csoportokon belül legnagyobb klinikai relevanciával bíró és a később bemutatásra kerülő eredményeink szempontjából releváns gének (*RUNX1*, *GATA2* és *TERC*) és azok eltéréseinek nyomán létrejövő predispozíciós szindrómák leukemogenezisre gyakorolt hatásának ismertetésére kerül sor.

#### *II.2.2.1 Germline RUNX1 mutációk talaján kialakuló familiáris myeloid kórképek*

Az előzetes thrombocyta-diszfunkcióval járó predispozíciós szindrómák a *RUNX1*, *ANKRD26* és *ETV6* germline mutációi következtében alakulnak ki, melyek közül gyakoriság és klinikai relevancia alapján is kiemelkednek a *RUNX1* transzkripciós faktort érintő eltérések. A *RUNX1* gén terméke a „core binding factor” (CBF) transzkripciós komplex DNS-kötő eleme, amely a hemopoézis szabályozásában tölt be szerepet [154]. A mutációk túlnyomó része a DNS-kötésért és fehérje-fehérje interakcióért felelős, erősen konzervált RUNT domént érinti. A régióban missense és nonsense mutációk, frameshift és kópiaszám-eltérésekkel járó variánsok is előfordulnak, de a myeloid kórképekben kongenitális transzlokációt is leírtak már [155]. A mutációk a gén által kódolt transzkripciós faktor működését befolyásolják, melynek zavara a myeloid sejtképzés és a normális thrombocyta-funkció megváltozásához vezet.

A *RUNX1* germline mutációi voltak a legkorábbi, familiáris myeloid megbetegedésekben leírt eltérések. Negyven évvel ezelőtt Luddy és mtsai. (1978) számoltak be egy thrombocytopeniával társuló „fatális kimenetelű myeloproliferatív kórképről”, melyet aztán egy újabb hordozó család és a betegségben érintett kromoszómakar azonosítása követett [156-158]. A molekuláris vizsgálati módszerek fejlődésének köszönhetően 20 évvel később Song és mtsai. (1999) azonosították elsőként a kórképek hátterében álló mutáns *RUNX1* gént [159].

A germline eltérések által létrehozott hereditár kórkép, a familiáris vérlemezke funkciózavar fokozott MDS/AML rizikóval (FPD-AML) autoszomális domináns öröklésmentet mutat és az esetek mintegy 40%-ában progrediál AML-be. A részleges

penetrancia oka nem teljesen ismert, de a manifeszt AML-es esetek nagy hányadában azonosítható a germline *RUNX1* eltérés mellett más géneket érintő kooperáló mutáció, amely valószínűsíti ezen eltérések fenotípust módosító hatását. Mindemellett gyakoriak a *RUNX1* szerzett mutációi és a germline variáns amplifikációja is, melyek szintén növelhetik az eredeti eltérés penetranciáját. A klinikai heterogenitás hátterében álló mechanizmusokról és a lehetséges kooperáló genetikai eltérésekről hiányosak az ismereteink.

A *RUNX1* központi szerepet tölt be a megakaryocyták érésében, ezért a funkcióvesztő mutációi talaján létrejövő prediszpozíciós szindrómában a vezető klinikai tünetek az enyhe/közepes thrombocytopenia és a változó mértékű vérzékenység, melyek már az AML/MDS manifesztációját megelőzően is jelen vannak [7]. Az autoszomális dominánsan öröklődő germline *RUNX1* mutációk a familiáris myeloid kórképeken kívül számos más hematológiai malignitás prediszponáló tényezői, így az AML/MDS mellett egyes lymphoid kórképek, mint a T-sejtes akut lymphoblastos leukémia (T-ALL) rizikóját is növelik [160, 161].

#### *II.2.2.2 Germline GATA2 mutációk talaján kialakuló familiáris myeloid kórképek*

Az előzetes szervi diszfunkcióval járó prediszpozíciós szindrómák közül a *GATA2*-érintettség talaján létrejövő entitások bírnak a legnagyobb klinikai relevanciával. A *GATA2* a hemopoézisben résztvevő transzkripciós faktort kódol, amely egyúttal a nyirokrendszer fejlődésében is fontos szerepet játszik. A mutációk általában a gén cinkujj-doménjeit érintik, de egyéb mutációs forrópontok is ismertek [162]. A prediszpozíciós szindróma kialakulásához vezető funkcióvesztő mutációk között missense és nonsense aminosavcserék, valamint kópiaszám-eltérések is előfordulnak [163]. A gént érintő germline eltérések mellett szomatikus mutációk is ismertek, amelyek nem mutatnak jellegzetes klinikai képet, megjelenésük megegyezik a normál karyotípusú AML-ével [164]. A jellegzetes klinikai képpel járó germline *GATA2* eltérésekről elsőként Hahn és mtsai. számoltak be familiáris MDS/AML-ben. Az általuk vizsgált négy család összesen 28 tagjában azonosítottak olyan germline *GATA2* mutációt, illetve néhány nukleotidot érintő deléciót, melyek az érintett családtagok esetében az AML megjelenését megelőzően immundeficienciára utaló kórképekkel, bőr manifesztációkkal és hypocelluláris csontvelőképpel társultak [165].

A biallélikus *GATA2* mutációk magas penetranciával rendelkeznek és elsősorban a fiatal életkorban megjelenő, autoszomális domináns öröklésmentet mutató familiáris AML/MDS rizikóját növelik. A monoallélikus mutációk a biallélikus variánsokhoz képest kisebb penetranciával bírnak, így az általában klinikai manifesztációval járó prediszpozíciós

szindróma ritkán aszimptomatikus maradhat [166]. A germline *GATA2* eltérések jellegzetes fenotípusokkal társulnak, melyeket egészen a közelmúltig külön entitásokként kezeltek, de a jelenlegi osztályozás szerint már ugyanazon, heterogén megjelenésű predispozíciós szindróma részei [7]. A többszervi diszfunkció tünetei közül kiemelendő az immunrendszert érintő MonoMac- és a nyirokereket érintő Emberger-szindróma, melyek a familiáris AML/MDS-asszociált *GATA2* mutációk leggyakoribb manifesztációi, de a monocytopenia és lymphoedema mellett az izoláltan megjelenő neutropenia és a csontvelőelégtelenség is a predispozíciós szindróma szerteágazó hematológiai tünetei közé tartozik [167, 168].

A germline *GATA2* mutáció talaján kialakuló familiáris myeloid kórképek közül az MDS magas rizikójú, az eltérést hordozó esetekben az átlagosnál nagyobb az AML-be történő transzformáció gyakorisága [169]. A manifeszt AML-re a gyakori kiújulás és terápia refrakteritás jellemző, így ezen entitás kezelésében megfontolandó a HSCT, azonban a germline *GATA2* predispozíció miatt ezek az esetek nagy körütekintést igényelnek. A mutációt hordozó családtagok még tünetmentes állapotban sem lehetnek donor kandidánsok, hiszen ilyen esetben a donor őssejtekből kiinduló, rossz prognózisú poszt-transzplantációs AML rizikója igen magas [170]. A *GATA2* germline mutációi a familiáris AML/MDS mellett más myeloid kórképben, így például congenitális neutropeniában és aplasticus anaemiában is ismertek, tovább bővítve a gén érintettsége nyomán kialakuló entítások heterogén csoportját [171, 172] .

### II.2.2.3 Germline *TERC* mutációk kapcsán kialakuló familiáris myeloid kórképek

Az előzetes szervi diszfunkcióval járó predispozíciók közül a *GATA2*-érintettség mellett a csontvelőelégtelenséggel (BMF: „bone marrow failure”) társuló germline predispozíciós szindrómák bírnak nagy klinikai jelentőséggel. A familiáris myeloid megbetegedést megelőző csontvelőelégtelenség leggyakrabban a telomerműködésben résztvevő gének, így a *TERC* és *TERT* germline mutációi nyomán alakul ki. A *TERT* a megfelelő telomerhossz fenntartásáért felelős reverz-transzkriptázt kódolja, melynek RNS komponense a *TERC* génről íródik át [173]. Az eddig leírt kis számú eltérés miatt a gének szerkezetében nem ismertek kiemelt jelentőségű mutációs forrópontok. A gyakoribb pontmutációk és kisebb kiterjedésű deléciók/inzerciók mellett a génekben DNS-kópiaszám változással járó, kiegyensúlyozatlan eltérések is előfordulnak, melyek a nukleotidcserékhez hasonló klinikai képet hoznak létre. A *TERC/TERT*, valamint *DKC1* és *NPM1* gének germline érintettsége nyomán létrejövő telomeropathiák együttesen a „telomere biology disorder” (TBD)



betegségcsoportot alkotják, melyek a predispozíciós szindrómák közül a legösszetettebb klinikai képpel társulnak [160, 173, 174].

A germline *TERC* mutációk és a TBD betegségek hereditár formái közötti kapcsolat régebb óta ismert, de a mutációk és a myeloid kórképek között fennálló összefüggés sokáig nem került leírásra. Elsőként Yamaguchi és mtsai. számoltak be a *TERC* gént érintő eltérések halmozódásáról több myeloid megbetegedésben, majd ezt követően már germline eltérést hordozó familiáris esetek is leírásra kerültek [173, 175-177]. A *TERC* germline eltéréseihez hasonlóan a *TERT* gént érintő mutációk is csontvelőelégtelenséggel járó predispozíciós szindróma kialakulásához vezetnek. Az első ilyen eltérést hordozó betegekről is Yamaguchi és mtsai. számoltak be mintegy 15 évvel ezelőtt [178].

A telomeráz komponenseit érintő germline mutációk a TBD betegségcsoportba tartozó dyskeratosis congenita (DC) kialakulásához vezetnek, amely entitás jellegzetes klinikai képpel társul. A rendszerint gyermekkorban manifesztálódó DC a bőrt és függelékkeit érintő tünetekkel, orális leukoplakiával, körömdisztrófiával és pigmentációs zavarokkal („café-au-lait” foltok) jelentkező kórkép, de más szervi diszfunkciók, így tüdőfibrózis, májcirrhosis és fej-nyak tumorok is kialakulhatnak [179]. A hematológiai tünetek közül a csontvelőelégtelenség emelendő ki, amely változó számú sejtvonalat érintő cytopenia formájában nyilvánul meg. A csontvelő-kimerülés lassú – és sok esetben tünetmentes – progressziója és a cutan manifesztációk hiánya miatt a betegség első tünete gyakran a már kialakult MDS/AML, ezért ezekben az esetekben a *TERC/TERT* gén érintettsége már csak az utólag elvégzett genetikai vizsgálatok során igazolódik. A DC talaján kialakuló familiáris myeloid kórképek rizikója 2%, az entitás a lymphoid leukemogenezisben a jelenlegi szakirodalmi adatok alapján nem tölt be fontos szerepet [180].

#### *II.2.2.4 Germline eltérések genetikai vizsgálatának jelentősége*

Az eddig ismertetett gének germline eltérései mind a familiáris MDS/AML predispozíciós szindrómái kapcsán azonosított hajlamosító genetikai variánsok, melyek vizsgálata a betegség etiológiájának meghatározásához ma már elengedhetetlen. A nagyszámú kandidáns gén vizsgálata ugyanakkor a rutin onkohematológiai diagnosztika során általában nehezen kivitelezhető, ami indokolja a nagy áteresztőképességű vizsgálati módszerek, például az NGS alkalmazását. A pontmutációk és néhány bázispárt érintő deléciók/inzerciók mellett az utóbbi időben előtérbe kerültek a germline DNS-kópiaszám változások (CNV: „copy number

variation”) is [181]. Ezen kiegyensúlyozatlan genetikai eltérések vizsgálatára alkalmas lehet a multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA) módszere [182].

Mindezen gének vizsgálata mellett a familiáris esetek mintegy 40%-ában sikerül azonosítani a háttérben álló genetikai eltérést, ami indokolja a rutinszerűen vizsgált gének számának növelését és egy, a klinikai képen alapuló diagnosztikai algoritmus kidolgozását, amely a specifikus tüneteket figyelembe véve a germline eltérés azonosítását is segíti [183]. A familiáris myeloid malignitások által érintett betegek azonosítása az eltérő klinikai viselkedés és a családban még tünetmentes hordozók azonosítása okán is jelentőséggel bír.

Mindazonáltal, kutatócsoportunk munkáját megelőzően hazánkban ezen hajlamosító eltérések vizsgálatára és így az érintett családok azonosítására nem került sor és az öröklődő variánsokkal kooperáló szomatikus genetikai eltérésekkel kapcsolatos tudásunk nemzetközi szinten is hiányos volt.

### III CÉLKITŰZÉS

A doktori tézisek alapjául szolgáló kutatómunka specifikus célkitűzései:

- 1) A follicularis lymphoma agresszív lymphomába történő transzformációjának háttérében álló genetikai eltérések és a klonális evolúció folyamatának feltérképezése.
- 2) Az *EZH2* mutációk jelentőségének és klonális architektúrájának feltárása follicularis lymphomában.
- 3) Az ibrutinib kezelés hatására kialakuló szubklonális evolúció feltérképezése krónikus lymphocytás leukémiában szenvedő betegekben.
- 4) A *BTK* és *PLC $\gamma$ 2* mutációk szerepének tisztázása az ibrutinib rezisztencia kialakulásában és korai előrejelzésében.
- 5) A *JAK2* és *CALR* driver mutációk mennyiségi meghatározásának és klinikai jelentőségének feltérképezése Philadelphia kromoszóma negatív krónikus myeloproliferatív neopláziákban (esszenciális thrombocythaemia és primer myelofibrózis).
- 6) A *CALR* mutációk fehérje-szintű, mennyiségi kimutatására alkalmas diagnosztikus eljárás kidolgozása Philadelphia kromoszóma negatív krónikus myeloproliferatív neopláziákban (esszenciális thrombocythaemia és primer myelofibrózis).
- 7) Klinikai szempontból jelentős csíravonalbeli genetikai eltérések azonosítása familiáris myeloid onkohematológiai kórképek esetében.
- 8) A klinikai heterogenitás háttérében álló kooperáló genomi változások azonosítása egy *GATA2* mutációt hordozó magas rizikójú myelodysplasiás szindrómában szenvedő család esetében.
- 9) A klinikai heterogenitás háttérében álló kooperáló genomi változások azonosítása egy *RUNX1* mutációt hordozó familiáris vérlemezke zavar – akut myeloid leukémia (FPD-AML) kórképben szenvedő hazai modell család esetében.

## IV ANYAG ÉS MÓDSZER

A 2009 és 2020 között végzett vizsgálatok több hazai és nemzetközi onkohematológiai és patológiai centrumban (részletesen a IV.1 fejezetben) gyűjtött betegcsoport több mint ezer mintájának bevonásával zajlottak. A metodikák vonatkozásában az alábbiakban a felhasznált reagensok, műszerek és technológiák ismertetésre kerülnek, azonban tekintettel az alkalmazott módszerek nagy számára, területi megfontolásokból a jelölt eltekintett az egyes módszerek részletes, protokollszerű ismertetésétől, figyelembe véve ezek elérhetőségét a gyártói leírásokban.

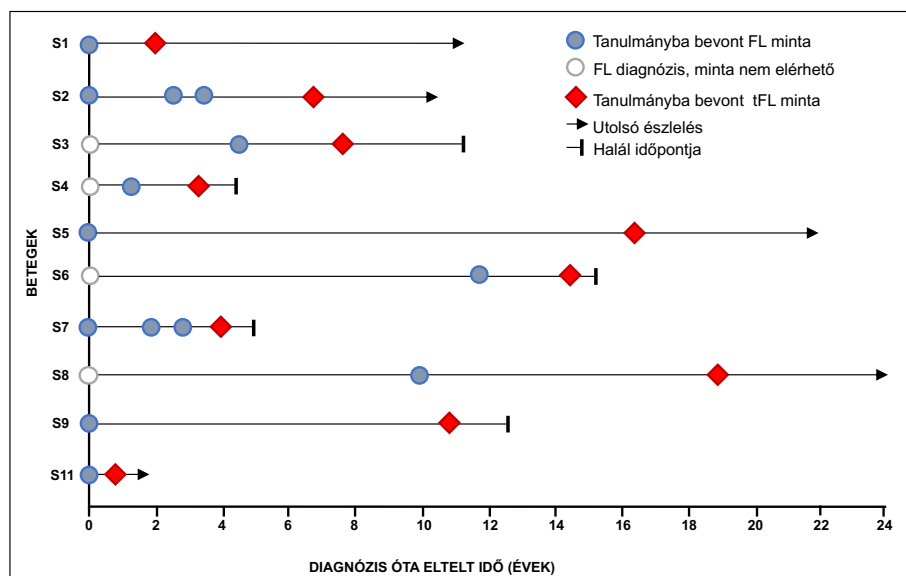
### IV.1 Vizsgálati minták

#### IV.1.1 Follicularis lymphoma

Az *EZH2* Y646 (korábbi terminológia alapján Y641) mutációk hagyományos szekvenálási eljárással történő vizsgálatához 221 FL-ben szenvedő beteg (118 férfi, 113 nő; medián életkor: 47 év (21-86 év)) nyirokcsomó biopsziás mintáit vontuk be. A szövettani grádus alapján 125 minta Grade I-nek, 61 minta Grade II-nek, 16 minta Grade III-nak bizonyult, míg 19 beteg esetében a grádus ismeretlen volt. A 221 vizsgálati mintából 56 a diagnózis (29 férfi, 27 nő; medián életkor: 53 év (30-86 év)), 165 a későbbi relapszus (89 férfi, 76 nő; medián életkor: 45 év (21-77)) időpontjában került begyűjtésre. A 20 éves teljes követési idő során a teljes betegcsoport 37%-ában (82/221) dokumentálták a betegség magas grádusú transzformációját. Az esetek a londoni Barts Cancer Institute (BCI) Onkohematológiai Központjának biobankjából származtak.

Az *EZH2* mutációk nagy érzékenységu vizsgálatához egyrészt a nemzetközi „Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project” (LLMPP) konzorcium (<https://llmpp.nih.gov/>) 181 FL betegből álló, klinikai követési valamint génexpressziós adatokkal kiegészített kohorszát használtuk [184], másrészt a fentebb ismertetett BCI betegcsoporttal átfedő további 185 beteg 56 diagnóziskori és 129 relapszuskori mintáját, valamint 33 beteg transzformáció előtti és a transzformációt követően gyűjtött mintapárjait elemeztük.

Az FL progresszió és transzformáció genom-szintű feltérképezésének céljából elvégzett teljes genom- vagy exomszekvenálási vizsgálatokhoz összesen 10 FL-ben szenvedő beteg szekvenciális mintáit (n=24) használtuk a BCI betegcsoportból a 18. ábrán feltüntettek alapján.



**18. ábra:** A teljes genom- (S1-S6) és exomszekvenálás (S7-S11) vizsgálatokba bevont follicularis lymphoma (FL) és transzformált FL esetek sorozatmintái.

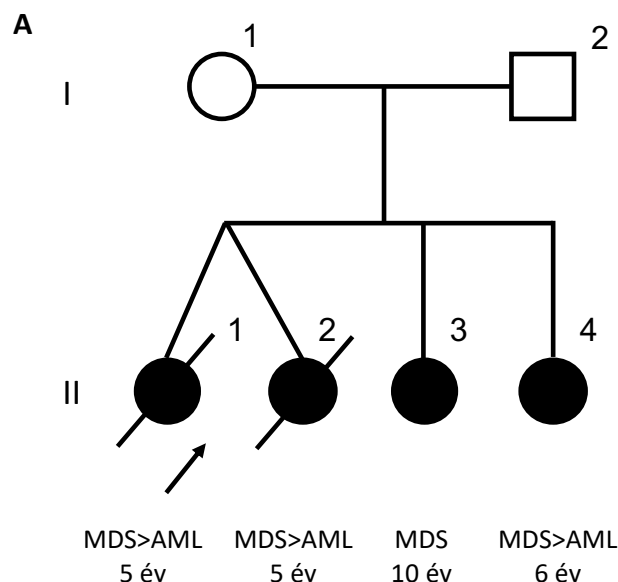
#### IV.1.2 Krónikus lymphocytás leukémia

Az ibrutinib terápia szelekciós nyomásának hatására kialakuló klonális evolúció új-generációs szekvenálással történő vizsgálatához 20 CLL-ben szenvedő beteg (12 férfi, 8 nő; medián életkor 63 év) szekvenciális mintáit (ibrutinib kezelés megkezdése előtt és az ibrutinib kezelés során gyűjtött perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből (PBMC) kivont DNS) vontuk be tanulmányainkba. Az ibrutinib monoterápiában részesülő betegcsoport az ibrutinib kezelést megelőzően változó számú kezelési vonalban részesült (kezelési vonalak száma: medián: 2, tartomány: 1-5). A vizsgált betegek kezdetben egyedi méltányossági kérelem elbírálását követően részesülhettek ibrutinib kezelésben, amely hazánkban ilyen formában 2014. július óta elérhető, így a betegcsoport a vizsgálat idejében a legnagyobb, klinikai tanulmányon kívüli ibrutinib kezelt kohorszot képviselte, amelyben kiterjedt genetikai vizsgálatokat végeztek. Az *IGHV* gén mutációs státuszát a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) legfrissebb ajánlása alapján határoztuk meg [185]. A 11q, 13q és 17p kromoszómaregiók delécióinak, valamint a 12-es kromoszóma triszómiájának analizését interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) végeztük Vysis próbák alkalmazásával (Abbott Molecular). A minták CLL-es sejtarányát áramlási citometriás mérésekkel határoztuk meg CD5/CD19/CD23/CD45 festés segítségével. A betegcsoport részletesebb jellemzése az Eredmények V.2 fejezetében található. Negatív kontrollként öt egészséges önkéntestől származó, PBMC-ből izolált DNS-t alkalmaztunk.

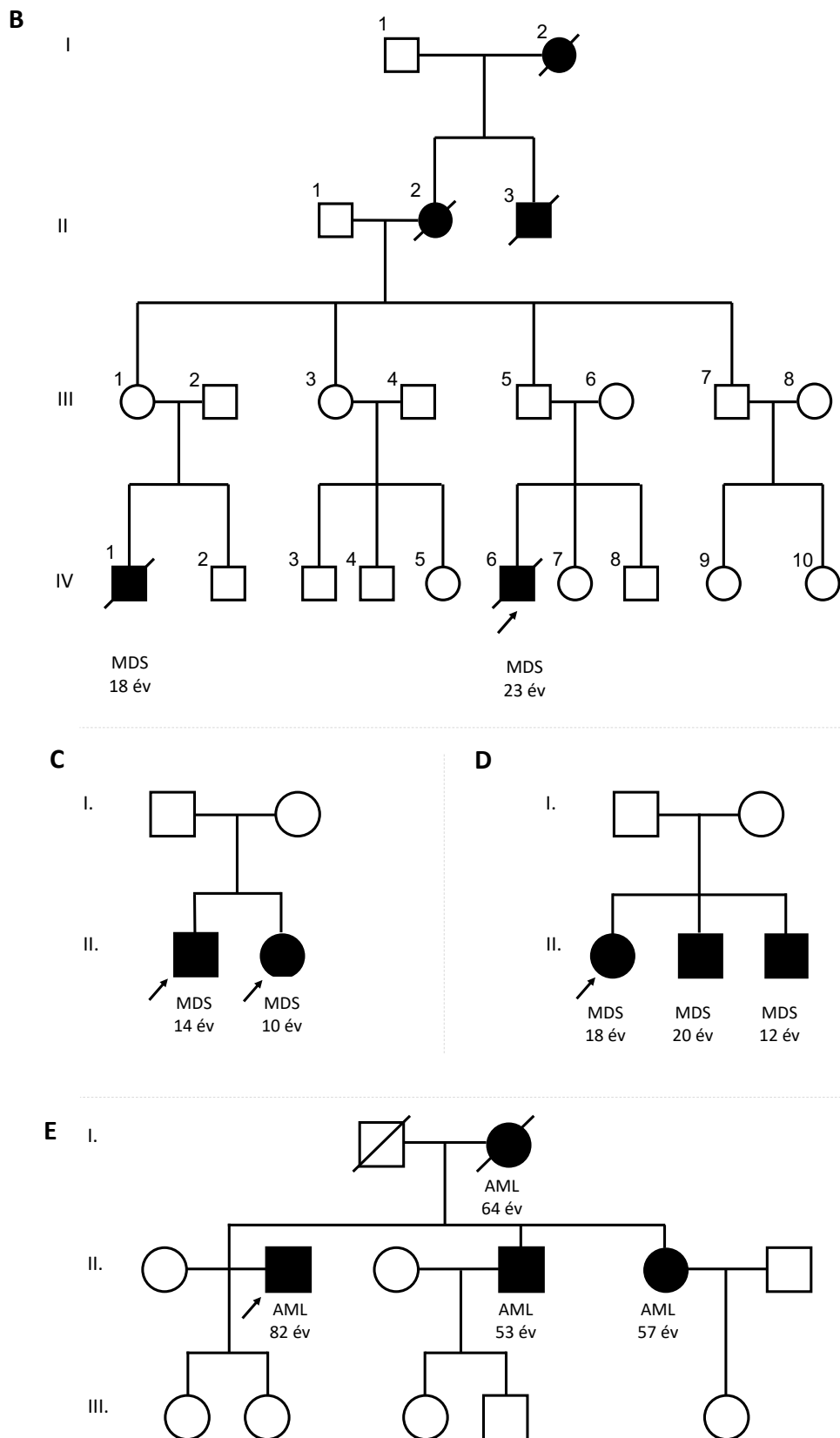
### IV.1.3 Familiáris myeloid kórképek

A familiáris MDS/AML esetek azonosítását és genetikai feltérképezését elsősorban a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet onkohematológiai diagnosztikus tevékenysége során a látóterünkbe került myeloid malignitások halmozódását mutató családok esetében végeztük el, míg egy familiáris MDS/AML eset a BCI biobankjából állt rendelkezésünkre. Az azonosított családok közül

- i) az első egy típusos FPD-AML esetnek bizonyult, négy testvérgyermekkel, akikben MDS vagy AML alakult ki 5-14 éves életkorban (19.A ábra),
- ii) a második család esetében magas rizikójú MDS alakult ki két elsőfokú unokatestvér esetében, a 7-es kromoszóma monoszómiájának kíséretében, 18 és 23 éves életkorban (19.B ábra),
- iii) a harmadik családban két vérlemezkeszám-csökkenés miatt követett testvérben alakult ki szimultán MDS 10 és 14 éves életkorban (19.C ábra),
- iv) a negyedik családban három testvér esetében manifesztálódott MDS 12, 18 és 20 éves életkorban (19.D ábra),
- v) míg az ötödik család esetében AML halmozódását figyeltük meg több generáción keresztül, összesen négy beteg esetében, 53-82 éves korban (19.E ábra).



**19. ábra: A:** Familiáris myeloid malignitások halmozódását mutató családok bemutatása az érintett egyének diagnózisának és életkorának feltüntetésével. A fekete nyilak az első érintett személyt (proband) jelölik az egyes családokban. (Rövidítések: MDS: myelodysplasiás szindróma, AML: akut myeloid leukémia).



**19. ábra (folytatás) B-E:** Familiáris myeloid malignitások halmozódását mutató családok bemutatása az érintett egyének diagnózisának és életkorának feltüntetésével. A fekete nyilak az első érintett személyt (proband) jelölik az egyes családokban.

#### IV.1.4 Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák

A *JAK2* V617F, *CALR* és *MPL* gének mutációs státusz meghatározásának céljából 652 Philadelphia kromoszóma negatív (Ph-) myeloproliferatív neopláziában (ET és PMF) szenvedő beteg perifériás vér vagy csontvelő aspirátum mintáit vizsgáltuk. A betegek diagnózisai a Semmelweis Egyetem (SE), a Pécsi Tudományegyetem (PTE) és a Szegedi Tudományegyetem (SZTE) Patológiai Intézeteiben 1976 és 2016 között születtek. A WHO 2008-as diagnosztikai kritériumai alapján a 652 beteg közül 425 esetben ET (131 férfi, 294 nő; medián életkor: 59 év, 4-97 év; medián követési idő: 62 hónap, 13-444 hónap) és 227 esetben PMF (112 férfi, 115 nő; medián életkor: 67 év, 23-93 év; medián követési idő: 42 hónap, 12-276 hónap) volt a diagnózis.

A *CALR* mutációk fehérje-szintű (immunhisztokémiai) mennyiségi kimutatásához a fentiek közül olyan ET és PMF esetek kerültek bevonásra, amelyek esetében a molekuláris vizsgálat során felhasznált perifériás vérminták mellett rendelkezésre álltak formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) csontvelői biopsziás minták is. A kiválasztott 117 esetből 69 ET (28 férfi, 41 nő; medián életkor 58,9 év, 4-84 év) és 48 PMF (24 férfi, 24 nő; medián életkor 64,5, 31-90 év) megbetegedések közé tartozott. Kilencvenegy beteg hordozott valamilyen *CALR* mutációt, a fennmaradó 26 mintát, melyekben *JAK2* V617F, illetve *MPL* mutáció jelenléte igazolódott, valamint a tripla negatív eseteket kontrollként alkalmaztuk. Ezen csontvelői biopsziás minták az SE és PTE Patológiai Intézeteiből származtak, az ET és PMF diagnózisok 2002 és 2016 között születtek.

A diagnózis időpontjában mért laboratóriumi paramétereket retrospektíven gyűjtöttük, míg a további klinikai adatok (többek között a leukémiás vagy myelofibrotikus transzformáció, cytoreduktív terápia szükségessége, thrombotikus epizód) a betegkövetés időtartama alatt kerültek összegyűjtésre. Major thrombotikus epizódnak számítottak az artériás trombózisok (ischaemiás stroke, tranzien ischaemiás attack, akut myocardialis infarktus és angina pectoris), valamint a vénás rendszer trombózisok (különös tekintettel az agyi sinusok és splanchnikus vénák érintettségére, pulmonális embóliára).

#### IV.2 DNS és RNS izolálás

DNS kivonást végeztünk valamennyi általunk vizsgált entitás szövetmintáiból további genetikai vizsgálatok kivitelezésének céljából hagyományos, szilika-oszlop alapú extrakciós eljárásokat alkalmazva. A DNS-izolálás perifériás vérmintából, nyirokcsomó biopsziás mintákból vagy csontvelő-aspirátumból a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)



segítségével történt a gyártó utasításai szerint. A DNS-koncentráció fotometriás mérését MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (Maestrogen) és NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) fotométerek segítségével végeztük 260 nm hullámhosszon. Az NGS alapú vizsgálatokhoz a DNS minták kvantifikációját a Qubit fluoriméter (ThermoFisher Scientific) segítségével végeztük. A DNS-mintákat a további vizsgálatokig 4 °C-on tároltuk. Teljes RNS kivonást végeztük 16 FL biopsziás minta esetében Trizol™ reagens (ThermoFisher Scientific) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

### IV.3 Teljes genomszekvenálás

Teljes genomszekvenálást (WGS) alkalmaztunk az FL transzformációjában szerepet játszó genetikai eltérések feltérképezésére összesen hat beteg szekvenciális mintáinak (8 FL és 6 tFL minta) esetében 100 bázispáros „paired-end” szekvenálási eljárással a HiSeq 2000 genetikai analizátor alkalmazásával a gyártó utasításainak megfelelően (Illumina). Valamennyi vizsgált beteg esetében rendelkezésünkre állt germline kontroll (perifériás vér) minta is, amelyeket szintén alávetettünk WGS vizsgálatnak.

### IV.4 Teljes exomszekvenálás

Teljes exomszekvenálással (WES) tártuk fel további négy FL-ben szenvedő beteg összesen 6 FL és 4 tFL mintájának (hozzájuk tartozó csíravonalbeli kontrollokkal egyetemben) teljes kódoló régióját a SureSelect XT Human All Exon V4 kit (Agilent) alkalmazásával. A 100 bázispár „paired-end” szekvenálás HiSeq 2500 készüléken (Illumina) zajlott a gyártó utasításainak megfelelően.

WES alkalmazásával azonosítottuk továbbá a kooperáló szomatikus pontmutációkat és kópiaszám-eltéréseket egy *RUNX1* mutációt hordozó familiáris vérlemezke zavar – akut myeloid leukémia kórképben szenvedő hazai modell család esetében (4 gyermek és a két szülő mintáit vizsgálva) a SureSelect All Exon V5 kit (Agilent) felhasználásával. A szekvenálás a HiSeq 2000 szekvenáló készülék (Illumina) alkalmazásával zajlott a gyártó utasításainak megfelelően.

#### IV.5 Célzott új-generációs szekvenálás

Célzott NGS vizsgálatot, ún. panel-szekvenálási vizsgálatot több entitás (FL és CLL) esetében is végeztünk az alábbiak alapján, valamennyi platform esetében a gyártói utasításoknak megfelelően.

- i) Az *EZH2* gén NGS analíziséhez a Titanium amplicon rendszert (454 Life Sciences) alkalmaztuk az összesen 432 FL mintán. Negyvenhat esetben került sor a teljes kódoló régió vizsgálatára (n=19 exon), a fennmaradó 320 esetben, valamint a 33 FL-tFL mintapáron a 16-os (Y646 kodon) és 18-as exonok (A682 és A692 kodonok) vizsgálatát végeztük el.
- ii) A WGS és WES kísérletek során azonosított 28 kandidáns gén (*BCL10*, *CARD11*, *CD79a*, *CD79b*, *CREBBP*, *EBF1*, *EZH2*, *HIST1H1B*, *HIST1H1C*, *HIST1H1D*, *HIST1H1E*, *HIST1H2AC*, *HIST1H2AG*, *HIST1H2BC*, *HIST1H2BD*, *HIST1H2BG*, *IKZF3*, *KLHL6*, *MEF2B*, *MLL2*, *MYD88*, *PLCG2*, *PRKCB*, *SOCS1*, *STAT3*, *STAT6*, *TNFAIP3* és *TNFRSF14*) NGS analízisét az Access Array platform (Fluidigm) alkalmazásával végeztük el 100 FL minta és 32 FL-tFL mintapár esetében MiSeq szekvenáló berendezés (Illumina) segítségével.
- iii) Az ibrutinib kezelés szelekciós nyomására lezajló klonális evolúciós folyamatát CLL-ben az esetek legalább 2%-ában mutációkat hordozó 30 célgén (*ATM*, *BCOR*, *BIRC3*, *BRAF*, *BTB*, *CHD2*, *DDX3X*, *EGR2*, *EIF2A*, *EP300*, *FBXW7*, *HIST1H1E*, *IGLL5*, *KLHL6*, *MLL2*, *LRP1B*, *MED12*, *MGA*, *MYD88*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *PLCG2*, *POT1*, *RIPK1*, *RPS15*, *SAMHD1*, *SF3B1*, *TP53*, *XPO1* és *ZMYM3*) ultramély célzott újraszekvenálásával vizsgáltuk 20 CLL-es beteg ibrutinib kezelés előtt és a kezelés során gyűjtött mintapárjainak analízisével. Az NGS vizsgálatot a TruSeq Custom Amplicon rendszerrel (Illumina) végeztük, amely során a 150 bázispáros „paired-end” szekvenálás MiSeq szekvenáló berendezésen (Illumina) zajlott.

## IV.6 Sanger szekvenálás

Sanger szekvenálással valamennyi, az értekezésben vizsgált entitás esetében végeztünk mutációanalízist. FL-ben az *EZH2* gén mutációs forrópontjait (16-os és 18-as exonok), familiáris myeloid kórképek esetében a *CEBPA*, *NPM1*, *FLT3*, *RUNX1*, *ASXL1*, *c-CBL*, *TET2*, *GATA2*, *ANKRD26*, *ETV6*, *DDX41*, *TERC*, *TERT*, *SRP72* géneket, valamint a Ph- MPN-ák esetében az *MPL* gén mutációs státuszának meghatározását, valamint a *CALR* mutációk pontos típusának meghatározását végeztük el e módszerrel. A mutációanalízis valamennyi esetben direkt szekvenálással történt. A fentebb említett gének célrégióinak amplifikációjához alkalmazott oligonukleotidok szekvenciája a 3. és 4. táblázatban látható.

**3. táblázat:** Az *EZH2*, *MPL* és *CALR* gének Sanger szekvenáláshoz használt oligonukleotidok szekvenciája.

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')
EZH2	E 16F	GTGTGCCCAATTACTGCCTT
EZH2	E 16R	AGCATGCAAATCCACAAAC
EZH2	E 18F	AGGCAAACCCTGAAGAACTG
EZH2	E 18R	GGAAGTAAAAGGGAGTTCCA
MPL	E 10F	CCGAAGTCTGACCCTTTTGT
MPL	E. 10R	ACAGAGCGAACCAAGAATGC
CALR	E 9F	AGTTTGGCAACGAGACGTG
CALR	E 9R	GAGTCTCACAGAGACATTATTTGG

A polimeráz-lánreakció (PCR) valamennyi amplikon esetében a standard protokolloknak megfelelően zajlott. A Sanger szekvenálást a BigDye terminator 3.1 kit (ThermoFisher Scientific) alkalmazásával hajtottuk végre, míg a kapilláris elektroforézis valamennyi esetben ABI 310 vagy ABI 3500 genetikai analizátorral (ThermoFisher Scientific) történt. Az elektroferogramok manuális elemzését a BioEdit [186] és Sequence Scanner (ThermoFisher Scientific) szoftverekkel végeztük. A mutációk jelenlétét valamennyi esetben mindkét DNS szárról történő kimutatással erősítettük meg. Sanger szekvenálást alkalmaztunk továbbá számos validációs kísérlet kapcsán is, amelyek során a különböző NGS vizsgálatok találatait kívántuk megerősíteni egyedi oligonukleotidok alkalmazásával.

**4. táblázat:** A familiáris AML/MDS esetek genetikai karakterizálásához alkalmazott primerek szekvenciái

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')
CEBPA	E 1F	TCGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC	TERT	E 12F	GGCAGGAGGCTCTTTGGAGC
CEBPA	E 1R	AGCTGCTTGGCTTCATCCTCCT	TERT	E 12R	CTGCAATCCAGAAACAGGCTGT
CEBPA	E 2F	GCTGGTGATCAAGCAGGAGC	TERT	E 13F	GTTCTCTTTTCTTCTCCATCTG
CEBPA	E 2R	CCGCCACTCGCGCGGAGGTCG	TERT	E 13R	GGGTCAGAGGTGAGCAGAGC
CEBPA	E 3F	GGCAGCGCGCTCAAGGGGCTG	TERT	E 14F	GCCCATGCCACACCCACGA
CEBPA	E 3R	CACGGCTCGGGCAAGCCTCGAGAT	TERT	E 14R	TTCACTCAGTCTCCTGACACAC
RUNX1	E 1F	GGAAAGGGGAACAGTTAAATTT	TERT	E 15F	GAGGGGAGCTGGGCTGGGC
RUNX1	E 1R	TTGGCTGTGGGTTGGTGAT	TERT	E 15R	AGGGCTGCTGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 3F	GCCTGTCTCCACCACCCTCTC	TERT	E 16F	CTAGGAGGGTTGGAGGATGC
RUNX1	E 3R	AGCTGCTTGTCTGAAGATCCG	TERT	E 16R	AGGGCTGCTGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 4F	GTGGGTTTGTGCCATGAAACG	TERC	1F	TCATGGCCGGAATGGAAC
RUNX1	E 4R	CATCCCTGATGTCTGCATTGTCC	TERC	1R	GGGTGACGAGTGCACACGAT
RUNX1	E 5F	CCCAAGGAATCTGAGACATGGTCC	GATA2	E 2F	ACACCTCGTGGTGGGACTT
RUNX1	E 5R	TGTTCAAGGCCACCAACCTCATTC	GATA2	E 2R	CGCCTGGGTTCTCATCAC
RUNX1	E 6F	GGGGGCCCATTTCTGTGAGAGG	GATA2	E 3F	CTGGTTCTGGGAGTCGTGAT
RUNX1	E 6R	GAGCATCAAGGGGAAACCCC	GATA2	E 3R	ATCTGGGAAACCAACTGTC
RUNX1	E 7F	AATCCACCCCACTTTACAT	GATA2	E 4F	GACTCCCTCCGAGAACTTG
RUNX1	E 7R	CTCAGCTGCAAAGAATGTGT	GATA2	E 4R	GCCTCTGCATTGGAAGGAGT
RUNX1	E 8F	TCCGCTCCGTTCTCTGC	GATA2	E 5F	TTAGCCCTCTTGACTGAGC
RUNX1	E 8R	GCTTGTCTGCGAACAGGAG	GATA2	E 5R	AGCCAAGCTGGATATTGTGG
ETV6	E 1F	GGGAGAGGAAAGGAAAGTGG	GATA2	E 6F	TGTTGTGGAGGAAGGAACT
ETV6	E 1R	AACAGAGCAACTGCAACAGC	GATA2	E 6R	GTCTCGACGTCATCTGTT
ETV6	E 2F	CCATTCCAAGCTTTCTATTGTC	ANKRD26	E1+5' UTR F	CGGGGCTGACTTGTATGTT
ETV6	E 2R	AAAACCACTCAGAGCTTGC	ANKRD26	E1+5' UTR R	GCCTACTCCAGTGGCACTCA
ETV6	E 3F	TTCAGCTGTCTAACTGACAAGA	DDX41	E 1F	CTTCACATCGGATTGGGCTCT
ETV6	E 3R	GGGGTGTTAAAGACCAACCA	DDX41	E 1R	TCCTCTGCTCTCATCTTC
ETV6	E 4F	TCCCTTCTCTTTTCTTTCCA	DDX41	E 2F	GCCTGAAGAGGGGAGCAG
ETV6	E 4R	CACGAAGAAGACCAGCTTATCA	DDX41	E 2R	GCCCTGGTGTACTGAAGCTC
ETV6	E 5F	GTCCTTCCCTCTGCTCCACA	DDX41	E 3F	GATCCTGACGCTGACCTTGT
ETV6	E 5R	GATCAGAGGGTGATGATGG	DDX41	E 3R	CCAGGCTCAGCTTCTCTTT
ETV6	E 6F	GCAGAAGCAGTTGCTGGATT	DDX41	E 4F	GGCGAAGAAGAAGCTGA
ETV6	E 6R	GGGCAGACGTAAAAAGCAGA	DDX41	E 4R	ATCCCTGCTGATACCATCT
ETV6	E 7F	GCAGTGCTTTTCTGAGGTT	DDX41	E 5F	GCAAAGAGTCTGCCAAGGAG
ETV6	E 7R	GGGTATCCGATAGGCAGGTA	DDX41	E 5R	ATCCTAAGCAAGGGCAACTG
ETV6	E 8F	TGGAATCTCTTACCTCCTCCA	DDX41	E 6F	ATGGTACATGAGGGATGCT
ETV6	E 8R	CCTTTTCACTCTCCTCAGC	DDX41	E 6R	CGTACAGCTGAGGCAACAAG
TERT	E 1F	TTCTTTCCGCGGCC	DDX41	E 7F	TGGGGCTCTGAGAAAGTACC
TERT	E 1R	CGAAGGCCAGCACGTC	DDX41	E 7R	GGGCCAATTTCAACAGAAGA
TERT	E 2/1F	GTGTCTGCTGAAGGAGCTG	DDX41	E 8F	GCAATGGCTAGGTGCTCTC
TERT	E 2/1R	CGGATGGGTGGGAGTGGCGC	DDX41	E 8R	ACAAAGGCTGGCACCAGAT
TERT	E 2/2F	GCGCTGCCACTCAGGCCGCG	DDX41	E 9F	GAGGGCAGGCCAGAGATT
TERT	E 2/2R	GTAGGGGCACTGCGCGTGGTTC	DDX41	E 9R	TTCCACAGACTCGCAGGTG
TERT	E 2/3F	GTTTCTGGAGCTGCTTGGGA	DDX41	E 10F	TGCCTGCTGCCTCTAGATA
TERT	E 2/3R	AGCCCCACTGCATTAGCT	DDX41	E 10R	GTCCCTGCACTGTGATGTGG
TERT	E 3F	GGGTTGGCTGTGTTCCGGCC	DDX41	E 11F	CCCTGTGTGCCCTTGGTC
TERT	E 3R	TGGAGACAGGCGCATGCTGA	DDX41	E 11R	CCAATCAGCTTCAGGGAGAC
TERT	E 4F	CTTGTTGGCTTCCCGTAGCT	DDX41	E 12F	GTGGCGGGTAAGCCTAATCT
TERT	E 4R	CCCTTCATCTAAGCTGATACCA	DDX41	E 12R	CAACTCCAGTCAGGGGCTAA
TERT	E 5F	TATGGTGGGGTGGGCACTTGG	DDX41	E 13F	ACAGAGTGCCAGGGGAGGT
TERT	E 5R	CTTGACAAAGTACAGCTCAGGCG	DDX41	E 13R	CTACTGCAGCAGGGTCCAAG
TERT	E 6F	TGAGGGCAGAGGTGATGCTG	DDX41	E 14F	CCATGGTGGCTCTGACAGT
TERT	E 6R	AGACACGACTGCATTCTAGACAC	DDX41	E 14R	GCCTAACCATGCCCCTTG
TERT	E 7F	CAGGTCCACACGTCCTGATCG	DDX41	E 15F	ATGGGTTAGGCCGAAAAG
TERT	E 7R	ATGAGCCCACTGATTGCCAG	DDX41	E 15R	ACCCAGGGAACAGCTAAGGT
TERT	E 8F	GAGGGTCTTGGCCACGTGGT	DDX41	E 16F	CCAGGTTCTGGCCACAGAG
TERT	E 8R	GCAGGAGAGAGGTGAGCAGAAG	DDX41	E 16R	ACCGGTTTACAGTTTCTGAC
TERT	E 9F	GTCCTACGTCCAGTGCCAGGG	DDX41	E 17F	TGCTGGAAGTCAGAAACGTG
TERT	E 9R	TCTTCAAGACAGAGCAGTCATG	DDX41	E 17R	GCAGTCTTGGGGACTGAGG
TERT	E 10F	GTTTGACATTAGTCCCTCGTAG	SRP72	E 6R	TTTCTTTCTGGTCAITTAGTGTT
TERT	E 10R	GCAGGACACGGGGGCTCAA	SRP72	E 7F	AAACAAAGCTCAAATGTCTGA
TERT	E 11F	AGCATTTAACAAGGGTGTGAGGT	SRP72	E 10F	TGAAAGAAATGGGATTATCC
TERT	E 11R	GCAGAGGTGGACGCAACGGC	SRP72	E 10R	CAATGAAGCCTCAGTAATCTATCA

#### IV.7 Droplet digitális PCR (ddPCR)

Droplet digitális PCR-t (ddPCR) alkalmaztunk az ibrutinib rezisztencia kapcsán kialakuló *BTK* Cys481Ser és *PLCG2* Asp993His mutációk szenzitív kimutatásának és nyomon követésének céljából CLL-ben, a vad és a mutáns lókuszekre specifikus, kereskedelmi forgalomban elérhető próbák (dsHsaMDS802598840 azonosítójú assay a *BTK* mutáció, dHsaMDS815970714 azonosítójú assay a *PLCG2* mutáció esetében) alkalmazásával a gyártó utasításainak megfelelően. A droplet létrehozására a QX200 Automated Droplet Generator eszközt, a leolvasásra a QX200 ddPCR rendszert (Bio-Rad) alkalmaztuk. Az eredmények kiértékelését a Bio-Rad QuantaSoft szoftverrel végeztük. A *BTK*<sup>mut</sup> és *PLCγ2*<sup>mut</sup> allélikus terhelést (fractional abundance, FA) a detektált mutáns DNS molekulák (*a*), valamint a mutáns (*a*) és vad (*b*) molekulák összegének hányadosaként határoztuk meg:  $[FA = a/(a + b)]$ . A későbbiekben az FA szinonimájaként a VAF fogalmát is használjuk.

#### IV.8 Valós-idejű kvantitatív PCR (RQ-PCR)

A *JAK2* V617F mutációs státuszt és a mutáns allél terhelést (másképpen: VAF) a Larsen és mtsai. [134] által korábban leírt módon, TaqMan-alapú valós-idejű kvantitatív PCR (RQ-PCR) vizsgálattal határoztuk meg 652 Ph- MPN esetben. A reakciókat a Quantstudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) használatával végeztük el. A minták *JAK2* V617F mutációs terhelését  $\Delta C_t$  módszerrel határoztuk meg [187], az alábbi képlet alkalmazásával:  $VAF = \Delta C_t - V617F / (\Delta C_t - WT + \Delta C_t - V617F) \times 100$ .

RQ-PCR-rel határoztuk meg továbbá az *EZH2* mRNS szintjét 16 FL mintában, gyárilag elérhető TaqMan assay (Hs00544830\_m1) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően.

#### IV.9 Fragmenshossz-analízis

A *CALR* gén 9-es exonjának mutációit nagy felbontású fragmenshossz-analízissel vizsgáltuk 652 Ph- MPN esetben. A célgén PCR amplifikációját a 3. táblázatban szereplő oligonukleotidok alkalmazásával végeztük el, a forward primer 5'-végén való 6-FAM fluoreszcens jelölést követően. A PCR során keletkezett fluoreszcensen jelölt DNS-fragmentumok hossz alapján történő szeparálását kapilláris elektroforézissel végeztük ABI3500 szekvenátor (ThermoFisher Scientific) segítségével. A *CALR* mutációs terhelést (*CALR*<sup>mut</sup>), azaz a mutáció mennyiségi meghatározását a fragmenshossz-analízis során

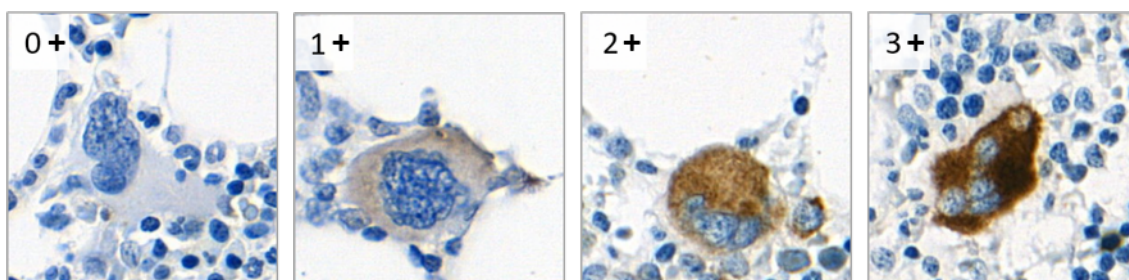
azonosított csúcsok amplitúdójának relatív arányából határoztuk meg az alábbi képlet alapján:  $CALR^{mut}/(CALR^{mut} + CALR^{vad})$ . A *CALR* mutáció pontos típusának meghatározását kétirányú Sanger-szekvenálással végeztük (lásd IV.6 rész).

#### IV.10 Immunhisztokémiai analízis: *CALR* mutációk fehérje-szintű kimutatása

Kilencvenegy, különböző *CALR* mutációt hordozó beteg FFPE csontvelő-biopsziás mintáján végeztük el az immunhisztokémiai (IHC) *CALR* mutációanalízist a mutáns *CALR* fehérjére specifikus CAL2 antitest használatával. Kontrollként az igazoltan *JAK2* V617F és *MPL* mutációkat hordozó 26 beteg, valamint a tripla negatív genotípussal rendelkező betegek csontvelői mintáit alkalmaztuk.

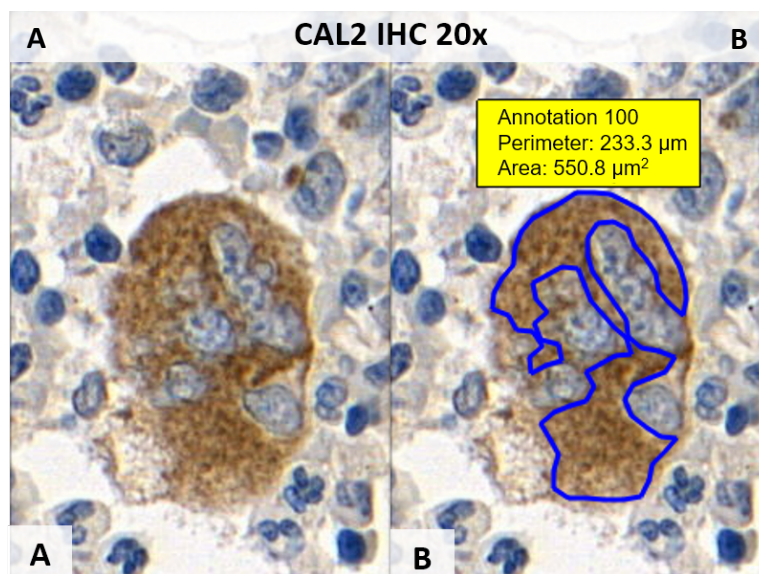
Az IHC reakciót a kereskedelmi forgalomban elérhető, mutált calreticulinra specifikus monoklonális antitesttel (CAL2 klón, DIA-CAL-250; Dianova) végeztük deparaffinizált metszeteken. Az endogén peroxidáz-működés blokkolását követően a metszeteket biotinmentes anti-egér IgG polimer-peroxidáz konjugátummal (Dako Cytomation) festettük meg. Az immunreakciókat diaminobenzidinnel (DAB) és kromogén hidrogén-peroxidáz szubsztráttal tettük láthatóvá, majd a megfestett metszeteket Pannoramic 250 Flash III szkennel segítségével digitalizáltuk (3DHISTECH). A digitalizált metszeteket Caseviewer szoftvert (3DHISTECH) alkalmazva vizsgáltuk.

Az IHC reakcióval detektált mutáns calreticulin fehérje expressziós szintjét manuálisan és automatizált képanalízis alkalmazásával is meghatároztuk. A mutáns calreticulin expresszió jelintenzitását két, egymástól független patológus vizsgáló végezte manuálisan. A jelerősséget 0, 1, 2 és 3 értékekben határoztuk meg, melyek megfeleltethetők a mutáns calreticulin fehérjét nem expresszáló, enyhén, közepesen és erősen expresszáló csoportoknak (20. ábra). Az egyes metszeteken 100 megakaryocita expressziós szintjét értékeltük, melyek számértékeit összeadva képeztük a manuális H-értéket (ún.  $H_{man}$ -érték), amely az egyes minták esetében 0 és 300 között változott. A vizsgálat során a mutáns calreticulin expressziót mutató nem-megakaryocita sejtek arányát is meghatároztuk.



**20. ábra:** Különböző CAL2 intenzitással jelölődő megakaryocyták. (Forrás: Mózes Réka doktori értekezés 2019, saját felvételek)

A CAL2 jelölés szoftveres kiértékeléséhez automatizált képanalízist alkalmaztunk (DensitoQuant modul; 3DHISTECH), melyhez vizsgálandó régióként metszetenként 100 megakaryocytá citoplazmát annotáltunk manuálisan a 21. ábrán szemléltetett módon. A vizsgált régiókban az immunfestés intenzitásának meghatározása pixelenként történt, amely során a szoftver a manuális kiértékeléshez hasonlóan minden vizsgált pixelhez egy számértéket rendelt (0-3; nem expresszáló, enyhén, közepesen és erősen expresszáló). A  $H_{\text{auto}}$ -értéket az alábbi képlettel határoztuk meg:  $(\text{enyhén pozitív pixelek aránya}) + (\text{közepesen pozitív pixelek aránya}) \times 2 + (\text{erősen pozitív pixelek aránya}) \times 3 = H_{\text{auto}}\text{-érték}$ . A  $H_{\text{auto}}$ -érték az egyes minták között 0 és 300 között változott és ezáltal összevethető volt a  $H_{\text{man}}$ -értékekkel.



**21. ábra:** Intenzív CAL2 jelölődést mutató megakaryocytá **A:** az annotáció előtt, és **B:** a citoplazma annotációját követően. A megakaryocytá citoplazmájának annotációja manuálisan történt caseviewer szoftverrel (3D HISTECH). (Forrás: Mózes Réka doktori értekezés 2019, saját felvételek)

## IV.11 Multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA)

MLPA alkalmazására a familiáris MDS/AML esetek genetikai hátterének feltérképezése során, valamint a CLL klonális evolúciójának vizsgálata kapcsán került sor. A familiáris MDS/AML vizsgálatára a SALSA P437-B1 azonosítójú szondakeveréket (MRC-Holland) használtuk, amely 5 célgén 42 lókuszának kópiaszám-eltéréseit, valamint három klinikailag releváns pontmutációt képes analizálni (5. táblázat). CLL esetében két szondakeverék alkalmazásával végeztünk vizsgálatokat (SALSA MLPA P037 CLL-1 és SALSA MLPA CLL-2; MRC-Holland), amelyek 76 régióban tették lehetővé a kópiaszám-eltérések analízisét. A vizsgált régiók pontos ismertetése a 6. táblázatban található.

A genomiális DNS-ből kiinduló reakció kivitelezése a gyártó utasításának megfelelően történt, a PCR termékek elválasztása kapilláris elektroforézissel zajlott ABI 3500 genetikai analizátor (ThermoFisher Scientific) segítségével. Az adatok értékelése a Coffalyser.Net ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) szoftverrel történt. A vizsgált régiók relatív kópiaszámát két lépésben (egyrészt a mintán belüli referenciaszondákhoz viszonyítva, másrészt a referencia mintákkal szembeni normalizáció által) határoztuk meg. Amplifikációt 1,3-nél magasabb relatív kópiaszám esetében, míg deléciót 0,7-nél alacsonyabb relatív kópiaszám érték esetén dokumentáltunk.

**5. táblázat:** A familiáris MDS/AML jellemzéséhez használt SALSA P437-B1 próbamix összetétele

Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)
GATA2	8	3q21.3	246	TERT	8	5p15.33	475
	8			TERT	7	5p15.33	195
GATA2	c.1192C>T (p.R398W) ◆	3q21.3	168	TERT	6	5p15.33	207
				TERT	5	5p15.33	454
GATA2	7	3q21.3	276	TERT	4	5p15.33	258
	7			TERT	3	5p15.33	296
GATA2	c.1061C>T (p.T354M) ◆	3q21.3	190	TERT	2	5p15.33	161
				TERT	1	5p15.33	178
GATA2	int 6	3q21.3	445	RUNX1	9 (10)	21q22.12	324
GATA2	6	3q21.3	142	RUNX1	8 (9)	21q22.12	301
GATA2	5	3q21.3	409	RUNX1	int 7 (ex 8)	21q22.12	157
GATA2	4	3q21.3	355	RUNX1	7	21q22.12	388
GATA2	3	3q21.3	219	RUNX1	6	21q22.12	439
GATA2	2	3q21.3	346	RUNX1	5	21q22.12	425
GATA2	1	3q21.3	316	RUNX1	4 (4b)	21q22.12	241
TERC	1	3q26.2	270	RUNX1	3	21q22.12	360
TERC	1	3q26.2	130	RUNX1	2	21q22.12	283

\* referenciaszonda

◆ pontmutáció



**5. táblázat (folytatás):** A familiáris MDS/AML jellemzéséhez használt SALSA P437-B1 próbamix összetétele

Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)
<i>TERC</i>	1	3q26.2	373	<i>RUNX1</i>	1	21q22.12	212
<i>TERC</i>	1	3q26.2	489	<i>FAF1*</i>		1p32	288
<i>CEBPA</i>	1	19q13.11	265	<i>CACNA1S*</i>		1q32	173
<i>CEBPA</i>	1	19q13.11	136	<i>DYSF*</i>		2p13	497
<i>CEBPA</i>	1	19q13.11	309	<i>ACVR2A*</i>		2q23	431
<i>TERT</i>	16	5p15.33	395	<i>ATP8A1*</i>		4p13	124
<i>TERT</i>	15	5p15.33	148	<i>PKHD1*</i>		6p12	253
	15			<i>PCSK5*</i>		9q21	184
<i>TERT</i>	c.3184G>A (p.A1062)◆	5p15.33	200	<i>STXBP1*</i>		9q34	381
				<i>UPF2*</i>		10p14	402
<i>TERT</i>	14	5p15.33	469	<i>SMPD1*</i>		11p15	505
<i>TERT</i>	13	5p15.33	366	<i>PSEN1*</i>		14q24	337
<i>TERT</i>	12	5p15.33	229	<i>SPG11*</i>		15q21	481
<i>TERT</i>	11	5p15.33	331	<i>MC4R*</i>		18q21	233
<i>TERT</i>	10	5p15.33	418	<i>SAMHD1*</i>		20q11	460
<i>TERT</i>	9	5p15.33	224				

\* referenciaszonda

◆ pontmutáció

Forrás: MRC-Holland, [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)**6. táblázat:** A CLL klonális evolúciójának vizsgálatához használt SALSA MLPA P037 CLL-1 és SALSA MLPA CLL-2 szondakeverékek összetétele.

SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverék				SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverék			
Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)
<i>REL</i>	7	2p16.1	223	<i>PTEN</i>	5	10q23.31	368
<i>REL</i>	11	2p16.2	292	<i>PTEN</i>	9	10q23.31	472
<i>ALK</i>	4	2p23.2	418	<i>ATM</i>	1	11q22.3	184
<i>ALK</i>	27	2p23.3	481	<i>ATM</i>	55	11q22.3	226
<i>MYCN</i>	2	2p24.3	178	<i>RDX</i>	11	11q22.3	281
<i>MYCN</i>	3	2p24.3	205	<i>ATM</i>	63	11q22.3	288
<i>MYCN</i>	2	2p24.3	247	<i>ATM</i>	13	11q22.3	373
<i>MYCN</i>	3	2p24.3	365	<i>ATM</i>	44	11q22.3	463
<i>AIM1</i>	2	6q21	436	<i>PPP2R1B</i>	4	11q23.1	338
<i>SEC63</i>	16	6q21	445	<i>CADM1</i>	1	11q23.3	361
<i>TNFAIP3</i>	9	6q23.3	211	<i>CD27</i>	3	12p13.31	142
<i>TNFAIP3</i>	2	6q23.3	493	<i>STAT6</i>	4	12q13.3	136
<i>LATS1</i>	4	6q25.1	457	<i>HMGA2</i>	2	12q14.3	418
<i>IGF2R</i>	3	6q25.3	235	<i>PAH</i>	4	12q23.2	240
<i>PARK2</i>	10	6q26	352	<i>IGF1</i>	4	12q23.2	310
<i>TNFRSF10B</i>	5b	8p21.3	241	<i>RB1</i>	17	13q14.2	160
<i>TNFRSF10A</i>	1	8p21.3	312	<i>DLEU2</i>	11	13q14.2	178
<i>EIF3H</i>	2	8q24.11	142	<i>KCNRG</i>	1	13q14.2	221

**6. táblázat (folytatás):** A CLL klonális evolúciójának vizsgálatához használt SALSA MLPA P037 CLL-1 és SALSA MLPA CLL-2 próbamix összetétele.

SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverék				SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverék			
Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma régió	Szondahossz (nukleotid)
<i>MYC</i>	3	8q24.21	160	<i>DLEU1</i>	downstream	13q14.2	381
<i>MYC</i>	3	8q24.21	281	<i>DLEU1</i>	2	13q14.2	402
<i>CDKN2B</i>	2	9p21.3	228	<i>RB1</i>	27	13q14.2	480
<i>CDKN2A</i>	3	9p21.3	256	<i>ATP7B</i>	4	13q14.3	245
<i>ATM</i>	14	11q22.3	173	<i>AKT1</i>	4	14q32.33	148
<i>ATM</i>	22	11q22.3	337	<i>KIA0125</i>	upstream	14q32.33	203
<i>LRMP</i>	21	12p12.1	321	<i>MTA1</i>	3	14q32.33	445
<i>CCND2</i>	5	12p13.32	358	<i>TP53</i>	1	17p13.1	166
<i>CDK4</i>	8	12q14.1	274	<i>TP53</i>	2a	17p13.1	198
<i>IFNG</i>	4	12q15	217	<i>TP53</i>	6	17p13.1	274
<i>CHFR</i>	4	13q14.2	400	<i>TP53</i>	5	17p13.1	319
<i>KCNRG</i>	3	13q14.2	148	<i>TP53</i>	10	17p13.1	346
<i>MIR15A</i>	1	13q14.2	166	<i>CDKN2D</i>	2	19p13.2	265
<i>FNDC3A</i>	6	13q14.2	190	<i>LDLR</i>	7	19p13.2	301
<i>DLEU2</i>	2	13q14.2	195	<i>CCNE1</i>	12	19q12	391
<i>RB1</i>	21	13q14.2	382	<i>AKT2</i>	6	19q13.2	328
<i>ATP7B</i>	6	13q14.3	306	<i>MIR498</i>	1	19q13.42	427
<i>DLEU7</i>	1	13q14.3	373	<i>COL11A1*</i>	15	1p21.1	454
<i>DLEU7</i>	2	13q14.3	466	<i>SERPINC1*</i>	5	1q25.1	172
<i>TP53</i>	4b	17p13.1	263	<i>ZNF638*</i>	2	2p13.2	355
<i>TP53</i>	7	17p13.1	286	<i>SCN1A*</i>	12	2q24.3	211
<i>TP53</i>	3	17p13.1	299	<i>GBE1*</i>	7	3p12.2	500
<i>TP53</i>	1	17p13.1	409	<i>IL4*</i>	1	5q31.1	130
<i>COL11A1*</i>	29	1p21.1	136	<i>GARS*</i>	5	7p14.3	258
<i>USH2A*</i>	60	1q41	154	<i>STX1A*</i>	8	7q11.23	294
<i>EDAR*</i>	3	2q12.3	267	<i>OPTN*</i>	11	10p13	192
<i>COL3A1*</i>	32	2q32.2	451	<i>RPGRIP1*</i>	20	14q11.2	490
<i>GBE1*</i>	7	3p12.2	500	<i>SEMA7A*</i>	15	15q24.1	436
<i>SCN5A*</i>	9	3p22.2	391	<i>ABAT*</i>	2	16p13.2	409
<i>KLKB1*</i>	3	4q35.2	184	<i>CACNG2*</i>	4	22q12.3	154
<i>NIPBL*</i>	5	5p13.2	200				
<i>IL4*</i>	1	5q31.1	130				
<i>KIAA0319*</i>	22	6p22.3	427				
<i>COL5A1*</i>	24	9q34.3	344				
<i>ABCC8*</i>	14	11p15.1	328				
<i>SPG11*</i>	36	15q21.1	472				

\* referenciaszonda

Forrás: MRC-Holland, [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)

## IV.12 Bioinformatikai analízisek

A IV.3-IV.5 fejezetekben ismertetett eljárásokkal 2009 és 2019 között generált NGS adatokat részletes bioinformatikai analízisnek vettük alá, amely során a Homo Sapiens referencia-genomhoz való illesztést követően a vizsgálatunk idején legkorszerűbbnek számító hiba-korrekciós algoritmusok és variáns-hívási eljárások alkalmazása után végeztük el a variánsok annotációját és klinikai interpretációját.

A WGS adatok esetében a humán referencia genomhoz (hg19) való illesztés az Illumina ELANDv2 aligner program segítségével történt. A PCR duplikátumok eltávolítása a CAVASA v18 ([http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/casava.ilmn](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/casava.ilmn)) programcsomag segítségével zajlott. A tumor- és a hozzájuk tartozó csírvonalbeli kontroll-mintákból az úgynevezett egy pontos nukleotid variánsok (SNV: „single nukleotid variant”) és az inzerciók-deleciók (indel) azonosítására a Strelka algoritmust használtuk [188]. Az SNV-k esetében a  $\geq 15$ , az indel eltérések esetében a  $\geq 30$  összesített szomatikus minőségi értékkel (ún. Q-score) bíró variánsokat tekintettük valós eltéréseknek.

A WES nyers adatok illesztése a Homo Sapiens referencia genom hg19 verziójához a Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 0.6.21 verziójával (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) történt [189], amit a SAM (Sequence Alignment Map) > BAM (Binary format of Sequence Alignment Map) konverzió és a PCR duplikátumok eltávolítása követett a Picard v1.86 szoftver (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) segítségével. Az SNV-k és indel eltérések meghatározásához a Strelka (FL esetében), valamint a MuTect és GATK (familiáris myeloid kórképek esetében) algoritmusokat használtuk [190, 191].

A WGS és WES analízissel azonosított variánsok annotálása az SNPnexus tool [192] segítségével történt. A dbSNP137 és HapMap adatbázisokban megtalálható polimorfizmusokat, valamint a germline kontroll mintákban megtalálható variánsokat kizártuk az analízisből. A transzkriptumok azonosításához és az aminosavcseréket eredményező eltérések annotálásához az Ensembl adatbázist használtuk. A variáns allélfrekvenciák (VAF) a mutációt hordozó read-ek és az összes read hányadosaként kerültek meghatározásra.

A kópiaszám eltérések (CNV) azonosítása a WGS és WES adatokból a VarScan2 [193] algoritmus segítségével történt, amit alléspecifikus szegmentációs analízis követett a Copynumber R programcsomag alkalmazásával [194]. Ez az analízis a heterozigotáság elvesztésének (LOH: „loss of heterozigosity”) és a szerzett uniparentális diszómia jelenlétének (aUPD: „acquired uniparental disomy”) vizsgálatát is lehetővé tette.

A WGS és WES adatokat felhasználva filogenetikai analíziseket végeztünk a „neighbour joining” algoritmus [195] és a PHYLIP programcsomag (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) alkalmazásával az FL transzformáció evolúciós lépéseinek tisztázásának céljából.

A szomatikus mutációk klonalitásának megítéléséhez szükséges tumorsejt arány és ploiditás („purity and ploidy”) meghatározásához az ABSOLUTE (<https://software.broadinstitute.org/cancer/cga/absolute>) és ASCAT [196] algoritmusokat alkalmaztuk.

A célzott újrászekvenálással nyert NGS adatok előzetes feldolgozása során a read-eket a *Homo sapiens* GRCh37 referenciagenomhoz illesztettük a BaseSpace Sequence Hub BWA v0.7.13 aligner szoftver alkalmazásával. A BAM fájlok válogatását és indexelését a SAMtools v1.7 és a GATK v4.0 modulokkal végeztük. A szisztémás szekvenálási hibák a Base Quality Score Recalibration szoftver segítségével kerültek kijavításra. Az SNV-k és indel eltérések azonosítására a LoFreq v2.1 variánskereső szoftvert alkalmaztuk [197]. Az elemzés során a szoftver minden azonosított variánshoz adott  $p$  értéket rendelt, amely lehetővé tette az álpozitív esetek pontos és egyértelmű kiszűrését. A LoFreq v2.1 által detektált nyers variánsok funkcionális annotációját az SnpEff v4.3 és az ANNOVAR v2017Jul17 eszközökkel végeztük, melyek közül az utóbbi a COSMIC, avSNP és CLINVAR adatbázisok frissített adatait is tartalmazza [198, 199]. A *TP53* gén kódoló régiójában azonosított variánsok annotációját a *TP53*-specifikus Seshat és IARC adatbázisok alapján is elvégeztük [200, 201].

#### IV.13 Statisztikai analízisek

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism szoftverrel végeztük. A komparatív analízisekhez két változó esetén normál eloszlást mutató folytonos változó esetében  $t$  próbát, nem Gauss-eloszlást mutató folytonos változó esetén Mann-Whitney U-próbát használtunk. Kettőnél több változó esetén ANOVA analízist alkalmaztunk. ANOVA analízis esetén post-hoc tesztként Tukey- vagy Bonferroni-teszt alkalmazása történt. Korreláció számításához Pearson-próbát használtunk. A túlélési analízishez Kaplan-Meier eljárást alkalmaztunk.

#### IV.14 Etikai vonatkozások

Valamennyi tanulmányunk a Helsinkai Nyilatkozattal összhangban, a résztvevő betegek mintavételt megelőző írásos beleegyezésével valósult meg, az alábbi releváns etikai engedélyek birtokában: London Research Ethical Committee (05/Q0605/140); Semmelweis Egyetem, Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKÉB 155/2012); Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKÉB: 14383-2/2017/EKU és 45371-2/2016/EKU).

#### IV.15 Pályázati támogatások

Az értekezésben bemutatott eredmények az alábbi pályázati támogatások segítségével valósultak meg: *i)* Európai Hematológus Társaság posztdoktori ösztöndíja (EHA Partner Fellowship, 2010-2012), *ii)* Nemzeti Kiválóság Program Szent-Györgyi Albert posztdoktori ösztöndíja (2013-2014), *iii)* Országos Tudományos Kutatási Alap posztdoktori pályázata (OTKA-PD\_108805 pályázat, 2013-2015), *iv)* Magyar Tudományos Akadémia Lendület pályázata (LP95021, 2015-2020), *v)* Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal K16 pályázata (NKFIH K16\_119950 pályázat, 2016-2020) és KH17 pályázata (NKFIH KH17\_126718 pályázat, 2017-2019), valamint *vi)* az Európai Bizottság és az NKFIH által finanszírozott ERA-PerMed konzorciális pályázata (ERA-PerMed pályázat, 2019-2022). Kutatásainkat részben támogatta az NKFIH Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Programjának pályázata is (NVKP\_16-1-2016-0004, 2017-2020).

## V EREDMÉNYEK

Az alább bemutatásra kerülő eredmények a jelölt elmúlt évtizedben közölt tíz idegennyelvű és három magyar nyelvű első- vagy utolsószerzős eredeti közleményeinek főbb megfigyeléseit foglalják magukban különböző onkohematológiai kórképek szomatikus és csírvonalbeli genetikai jellemzésének témakörében.

### V.1 Follicularis lymphoma transzformációjának feltérképezése és új mutációs célpontok azonosítása

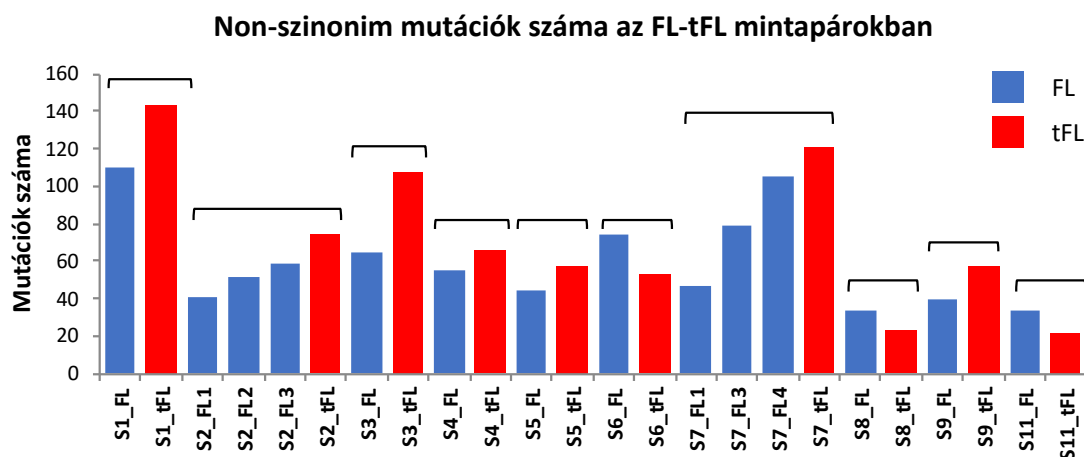
Teljes genom- és exomszekvenálás (WGS és WES) alkalmazásával tíz, FL-ben szenvedő beteg transzformáció előtti (FL) és azt követő (tFL) szövetminta párait vizsgálva feltérképeztük az FL agresszív lymphomába történő transzformációjának hátterében álló legfontosabb genetikai léziókat, amely során számos új mutációs célpontot, valamint a transzformáció evolúciójának mintázatait is azonosítottuk [202]. A szekvenálási adatok a „European Genome-phenome Archive (EGA)” adatbázisba kerültek feltöltésre az alábbi egyedi azonosítóval: EGAS00001000399.

#### V.1.1 Az FL transzformációjának genom-szintű mutációs profilja

A WGS-sel vizsgált hat mintapár esetében összesen 1000, fehérje-szerkezetet módosító mutációt azonosítottunk 584 génben. A WES-sel analizált négy FL-tFL mintapár esetében 560 fehérje-eltérést okozó mutációt azonosítottunk 359 génben. A mintánkénti non-szinonim mutációk száma 21 és 143 között változott, az esetek többségében magasabb mutációs terhelést detektáltunk a tFL mintákban (22. ábra).

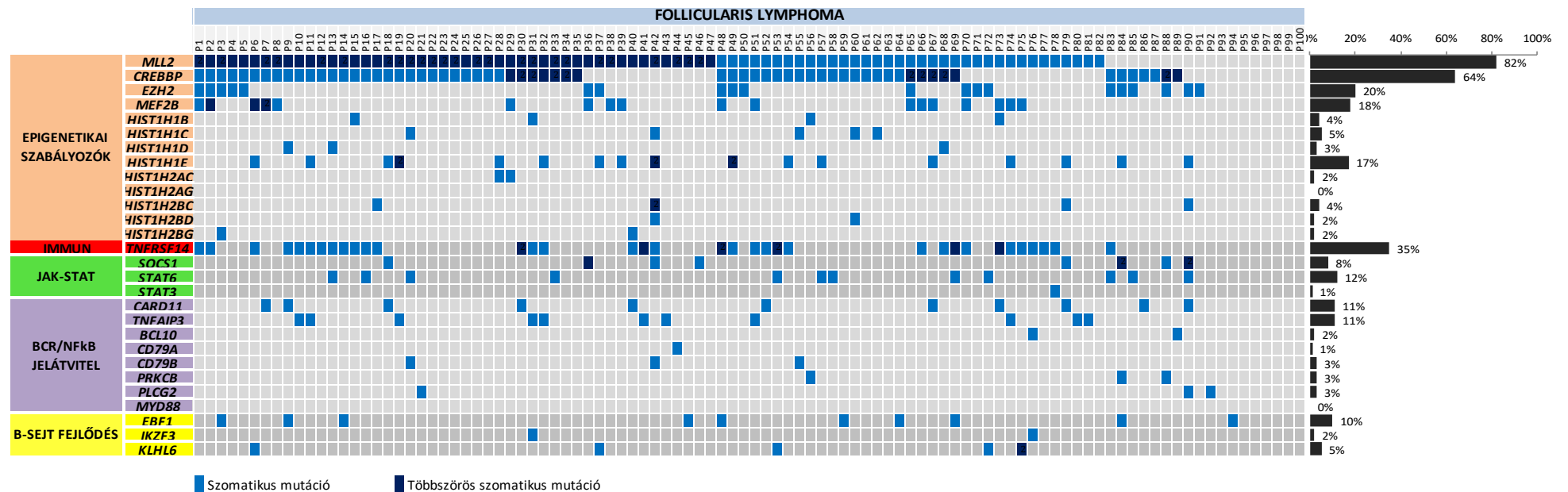
Az azonosított variánsok teljes listája a releváns publikáció [202] függelékében található, terjedelmi okokból a továbbiakban a főbb jelpályák és érintett komponenseik ismertetésére szorítkozunk.

A genom-szintű analízisek során gyakori mutációkat azonosítottunk a linker hiszton génekben (*HIST1H1C*, *HIST1H1E*, *HIST1H2AC*, *HIST1H2BC*, *HIST1H2BD*, *HIST1H2BG*), az epigenetikai gépezet enzimeit kódoló génekben (*CREBBP*, *EZH2*, *MEF2B*, *MLL2* a JAK-STAT- (*SOCS1*, *STAT3*, *STAT6*) és az NFκB -jelátviteli utak (*CARD11*, *CD79a*, *CD79b*, *MYD88*, *PLCG2*, *TNFAIP3*) komponenseiben, valamint a B-sejt fejlődésért felelős gének egy csoportjában (*EBF1*, *IKZF3*, *KLHL6*).



**22. ábra:** A teljes genom- és exomszekvenálás során azonosított non-szinonim mutációk számának alakulása a follicularis lymphoma (FL) és transzformált FL (tFL) mintapárok, illetve sorozatminták esetében.

A WGS és WES által újonnan azonosított, mutációs célpontokat érintő szomatikus mutációk gyakoriságát és a betegség progressziója során betöltött szerepüket célzott újraszekvenálással határoztuk meg további 100 FL minta és 33 FL-tFL mintapár vizsgálatával. A relevánsnak vélt 28 gén (*BCL10*, *CARD11*, *CD79a*, *CD79b*, *CREBBP*, *EBF1*, *EZH2*, *HIST1H1C*, *HIST1H1E*, *HIST1H2AC*, *HIST1H2BC*, *HIST1H2BD*, *HIST1H2BG*, *IKZF3*, *KLHL6*, *MEF2B*, *MLL2*, *MYD88*, *PLCG2*, *PRKCB*, *SOC1*, *STAT3*, *STAT6*, *TNFAIP3*, *TNFRSF14*, *HIST1H1D*, *HIST1H2AG*, *HIST1H1B*) nagy érzékenységgű NGS analízise során megfigyeltük, hogy a betegek több mint 70%-a hordoz visszatérő mutációkat legalább két epigenetikai szabályozást kódoló génben az *MLL2*, *CREBBP*, *EP300*, *EZH2* gének közül. A betegek 28%-ában mutattunk ki mutációkat legalább egy H1 linker génben, míg a JAK-STAT útvonalhoz tartozó *STAT6* és *SOC1* mutációk gyakorisága 12% illetve 8%-nak adódott. Gyakori mutációkat hordozott továbbá a B-sejt fejlődésben kiemelt szerepelt betöltő *EBF1* gén (17%), valamint az NFκB útvonal negatív szabályozói közül a *CARD11* (11%) és *TNFAIP3* (11%) gének. A 100 FL minta esetében végzett analízis áttekintő eredményei az alábbi hőtérképen láthatók (23. ábra).



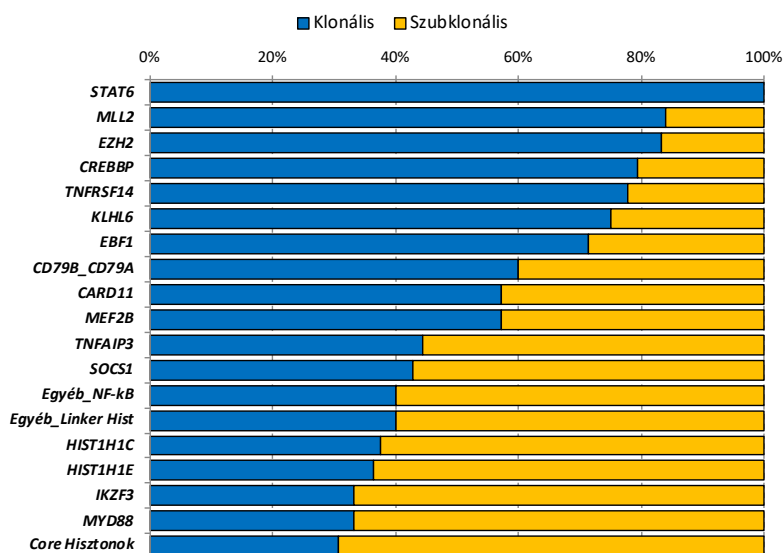
**23. ábra:** Huszonnyolc célgén célzott új-generációs szekvenálással végzett analízisének hőterképszerű áttekintése 100 follicularis lymphoma minta esetében az érintett gének mutációinak és a mutációs gyakoriságok feltüntetésével.



## V.1.2 FL transzformáció evolúciós mintázatai

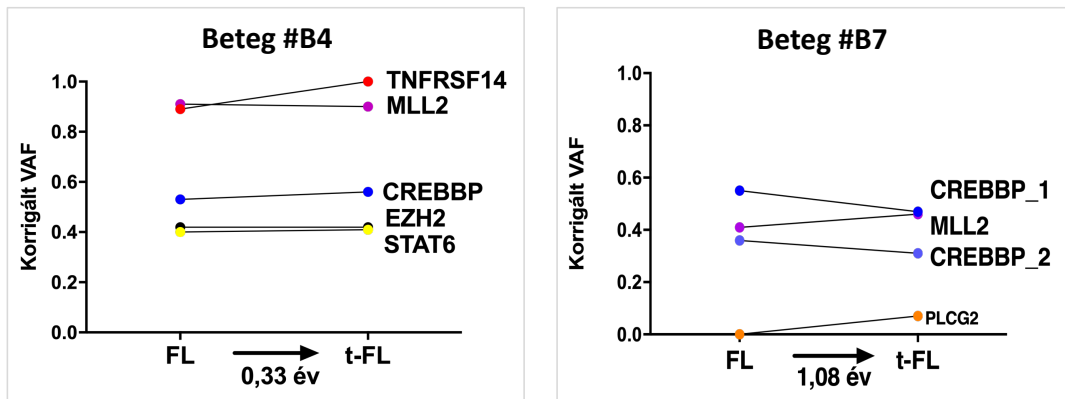
### V.1.2.1 Klonális események azonosítása az FL patogenezisében és transzformációjában

A korai (klonális) és késői szubklonális genetikai események elkülönítésének céljából 33 FL-tFL mintapár esetében elemeztük a 28 fentebb ismertetett génben detektált mutációknak a tumorsejtaránytal korrigált allélfrekvenciáját az *ABSOLUTE* algoritmus segítségével. Az analízis eredményei alapján az FL patogenezisében és transzformációjában döntően klonális (korai) eseménynek tekintettük a hiszton modifikációban részt vevő gének (*MLL2*, *EZH2*, *CREBBP*), a B-sejt fejlődésben szerepet játszó (*EBF1*, *KLHL6*), valamint a *STAT6* és *TNFRSF14* gének mutációt (24. ábra).



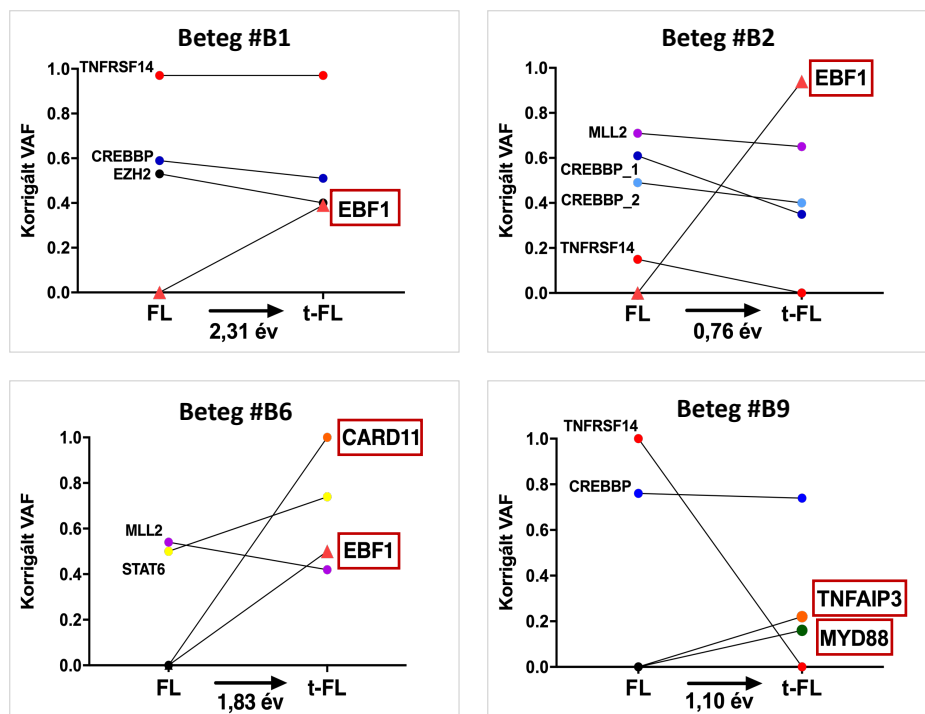
**24. ábra:** A 28 vizsgált gént érintő szomatikus mutációk klonalitásának rekonstrukciója a célzott újraszekvenálással nyert adatokból bioinformatikai algoritmusok segítségével. A kék sávok jelzik az adott gént érintő mutációk között a klonális variánsok arányát.

Érdekes módon ezen gének esetében gyakran figyeltünk meg kópiaszám-eltérést is (delécio vagy aUPD), ami az adott mutáció homozigótává válásának hátterében álló esemény. Továbbá ezen gének mutációi az esetek többségében a kezelés ellenére perzisztáló, a betegség transzformációja során is stabil eltérésnek bizonyultak (25. ábra), ami arra utal, hogy a betegség egyes relapszusainak rezervoárjaként szolgáló CPC populációban megjelenő úgynevezett alapító genetikai eltéréseknek tekinthetők.



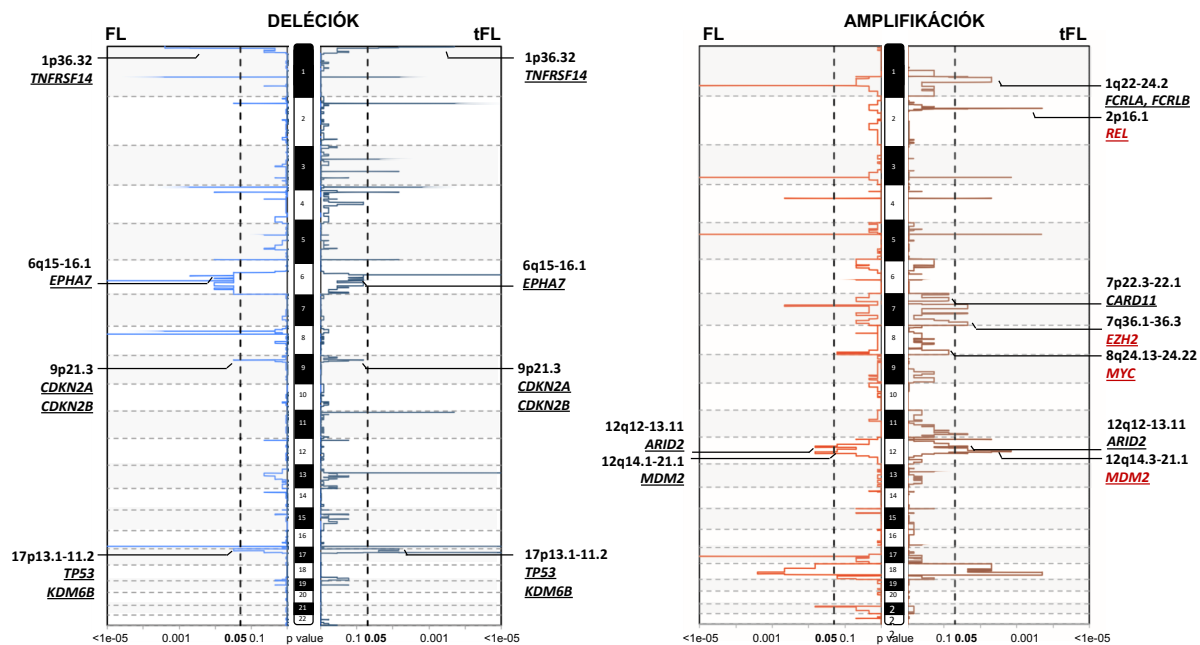
**25. ábra:** Klonális és a betegség progressziója során döntően klonális stabilitást mutató genetikai eltérések szemléltetése két beteg esetében 28 célgén új-generációs szekvenálási adatai alapján. Rövidítések: VAF: variáns allélfrekvencia, tFL: transzformált follicularis lymphoma

A transzformációval legszorosabb kapcsolatot mutató genetikai eltérésként a B-sejt fejlődésben (*EBF1*) és az NFκB jelátvitelben szereplő gének (*MYD88*, *CD79B*, *CARD11*, *TNFAIP3*) mutációit azonosítottuk, amelyek számos esetben a tFL mintákban jelentek meg és nagy érzékenységű NGS vizsgálattal sem voltak kimutathatók a transzformációt megelőző mintákban. A 26. ábra ezen úgynevezett „progresszor” genetikai eltérések megjelenését illusztrálja néhány beteg példáján.



**26. ábra:** A B-sejt fejlődésben szerepet játszó EBF1, valamint az NFκB jelátvitel komponensek *CARD11*, *TNFAIP3* és *MYD88* progresszor mutációnak megjelenése a transzformált FL mintákban. Rövidítések: tFL: transzformált follicularis lymphoma; VAF: variáns allélfrekvencia.

A kópiaszám-eltérések (CNV) genom-szintű vizsgálata során a tFL mintákban nagyobb számú CNV-t detektáltunk, melyek közül kiemelendők az *EZH2*, *MDM2*, *MYC* és *REL* géneket érintő kromoszómarégió-nyerések (27. ábra).



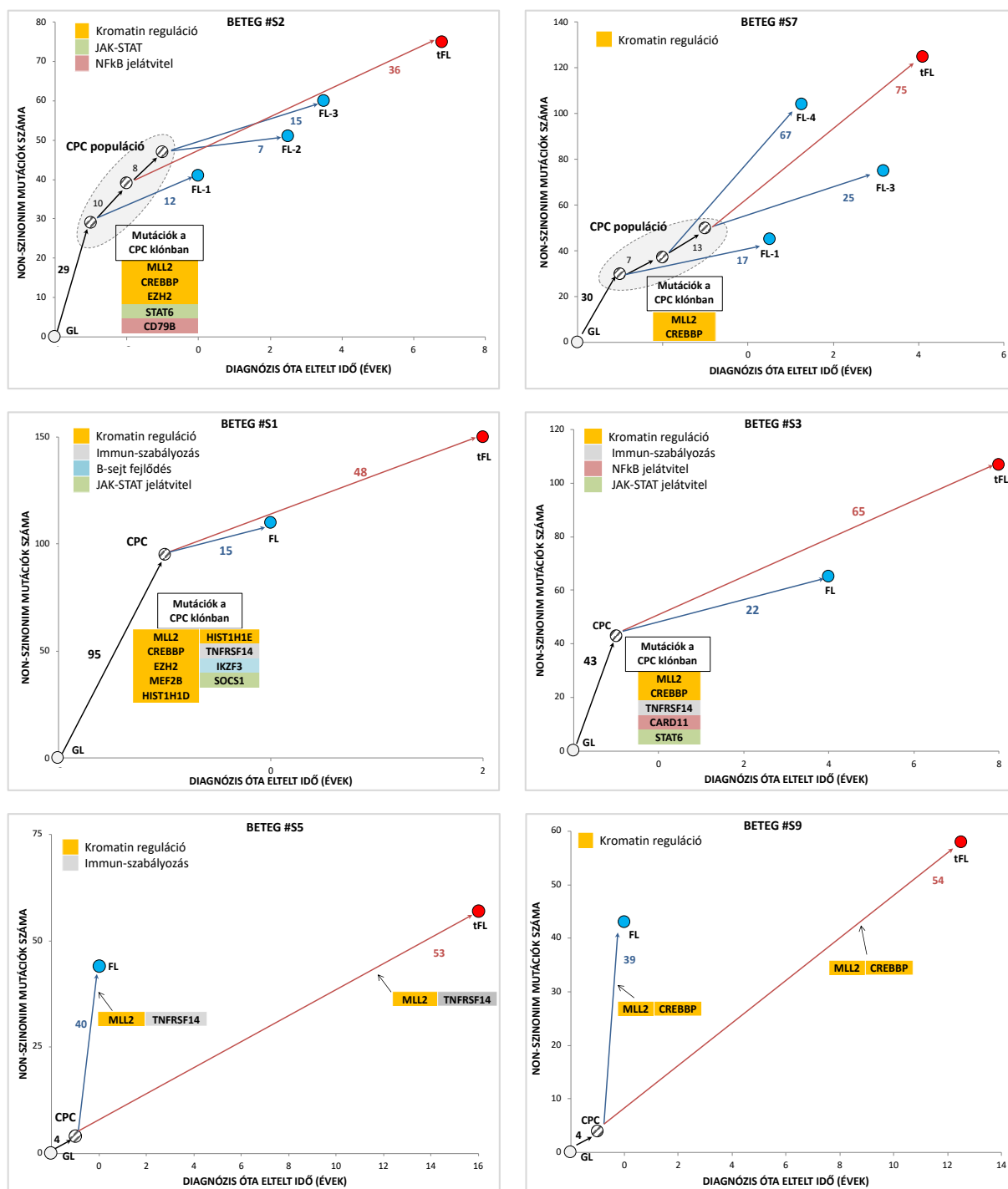
**27. ábra:** Visszatérő kópiaszám-eltérések (deléciók és amplifikációk) azonosítása FL-tFL mintapárokból úgynevezett *Gistic plot* megjelenítéssel. A szignifikáns (szaggatott vonalon túlnyúló) eltéréseket reprezentáló csúcsok mellett az érintett lokuszok láthatóak. A tFL mintákban gyakran figyeltük meg a *EZH2*, *MDM2*, *MYC* és *REL* géneket (pirossal kiemelve) érintő amplifikációkat.

### V.1.2.2 Közös progenitor klón (CPC) koncepció az FL transzformációjában

Az NGS analízisek által azonosított nem-szinonim mutációkat felhasználva filogenetikai fákat szerkesztettünk valamennyi FL-tFL mintapár és sorozatminta esetében, rekonstruálva a szomatikus mutációs események kronológiáját. A filogenetikai analízisek lineáris evolúció helyett úgynevezett elágazó (divergens) evolúciót jeleztek az FL transzformációjának lehetséges mechanizmusaként. Eredményeink alapján e folyamatban központi szerepet tölt be a CPC, amely mintegy rezervoárjaként szolgál a betegség újabb epizódjait majd a transzformációt kialakító daganatsejteknek.

A CPC-k gyakran hordoztak mutációkat az epigenetikai gépezet enzimeiben (*MLL2*, *CREBBP*, *EP300*, *EZH2*), valamint a JAK-STAT jelátvitel (*SOCS1*, *STAT6*) és az NFκB jelátvitel komponenseiben (*BCL10*, *CARD11*, *CD79b*). A filogenetikai analízis eredményei arra is utaltak, hogy míg az *MLL2*, *CREBBP* és *EZH2* eltérések korai eseménynek számítanak a tumor evolúciós folyamatában, addig az *EBF1*, *MYD88* és *TNFAIP3* gének eltérései a transzformáció során alakulnak ki.

Az FL transzformációja során a CPC vonatkozásában kétféle mintázatot definiáltunk: a gyakoribb forgatókönyv, az úgynevezett „rich-CPC” modell esetében a CPC populáció genetikai eltérésekben gazdag, számos olyan driver mutációt hordoz, amelyek az FL és tFL betegség epizódokban is kimutathatók (28. ábra, #S2, #S7, S#1 és #S3 számú beteg). A ritkább forgatókönyv során (összesen két beteg esetében dokumentálva), az úgynevezett „sparse-CPC” modell esetében a CPC populáció kevés genetikai eltérést tartalmaz azonban érdekes módon ezen esetekben gyakran figyeltük meg a konvergens evolúció jelenségét, amely során egymástól függetlenül, az FL és tFL kialakulása során is megjelentek ugyanazon gének driver mutációi, utalva ezen eltérések kritikus szerepére a betegség patogenezisében és progressziójában (28. ábra, #S5 és #S9 számú beteg).



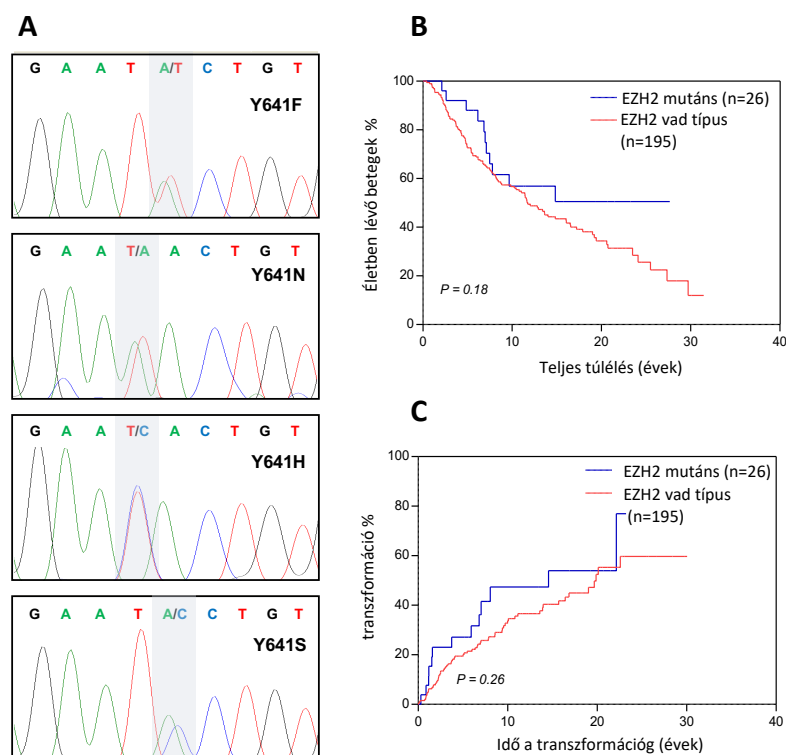
**28. ábra:** A teljes genom- és exomszekvenálás során azonosított non-szinonim mutációk alapján rekonstruált filogenetikai fák, amelyek a betegség evolúcióját szemléltetik négy beteg esetében. Az egyes ágak mentén szereplő számok az adott mintában kimutatott mutációk számát jelölik. A sávozott körök a hipotetikus közös progenitor sejt/klont jelölik, amely a betegség progressziójának és transzformációjának rezervoárját szolgáltatja. Az #S2, #S7, #S1 és #S3 számú betegek esetében ún. „rich-CPC” mintázatot azonosítottunk, amely esetében a betegség progressziója szempontjából kritikus genetikai eltérések már a CPC szintjén megjelennek. Az #S5 és #S9 számú betegek esetében („sparse-CPC” forgatókönyv) a CPC kevés mutációt tartalmaz, azonban a kritikus jelentőségű genetikai eltérések egymástól függetlenül, konvergens evolúció útján alakulnak ki a betegség egyes epizódjaiban. Rövidítések: CPC: közös progenitor klón; GL: germline

## V.2 Az *EZH2* mutációk feltérképezése és klinikai jelentőségük meghatározása folliculáris lymphomában

Az *EZH2* hiszton-metiltranszferázt vizsgáló tanulmányaink során meghatároztuk a gént érintő mutációk gyakoriságát és klinikai relevanciáját nagyszámú FL betegcsoportok esetében, valamint funkcionális vizsgálatokat is végeztünk a mutációk következtében megváltozott H3K27 trimetiláció (H3K27Me3) vonatkozásában [30]. Később lehetőségünk nyílt az *EZH2* mutációk nagy-érzékenységű vizsgálatára és az FL szubklonális architektúrájában betöltött szerepük meghatározására is [31].

### V.2.1 *EZH2* mutációk vizsgálata hagyományos Sanger szekvenálással

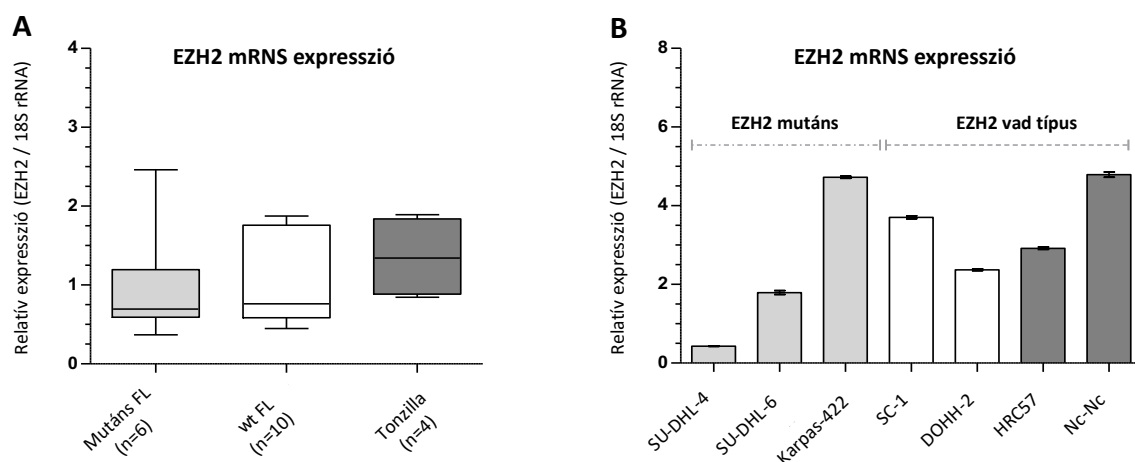
Az *EZH2* gén Y646 (korábbi terminológia alapján Y641) kodonját vizsgálva az esetek 12%-ában (26/221) azonosítottunk összesen négyféle (Y646F, Y646N, Y646H és Y646S) szomatikus *EZH2* mutációt (29.A ábra). A 31 FL-tFL mintapár esetében a betegek 29%-ában (9/31) mutattunk ki *EZH2* Y646 mutációt. Az *EZH2* mutációs státusz nem mutatott összefüggést a betegek teljes túlélésével és a transzformáció kialakulásával (29.B ábra).



**29. ábra:** **A:** A különböző típusú *EZH2* Y646 mutációk reprezentatív elektroferogramjai. A korábbi terminológia alapján, az eredeti publikációval megegyezően az ábrán Y641-ként szerepelnek a variánsok. Az *EZH2* mutációk nem mutattak szignifikáns összefüggést a betegek **B:** teljes túlélésével és **C:** a transzformáció kialakulásával sem.

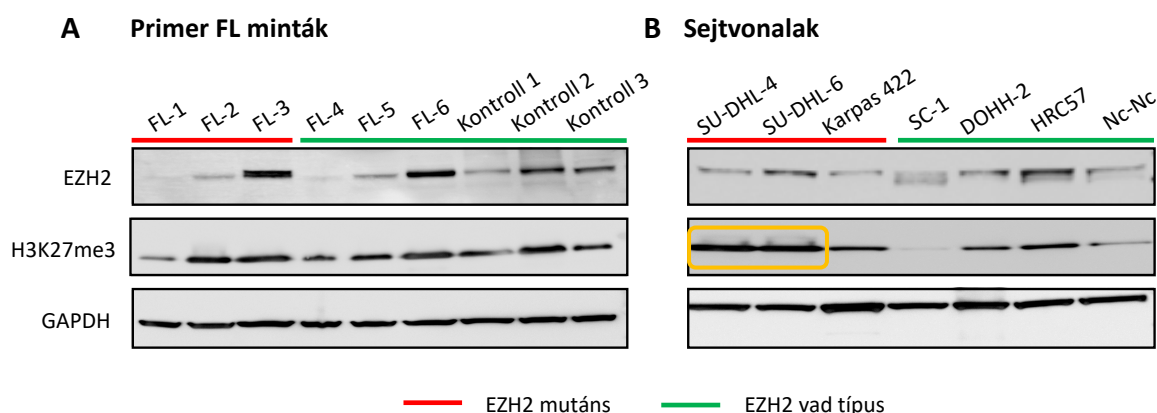
## V.2.2 *EZH2* mutációk funkcionális vizsgálata

Az *EZH2* mutációk hatását az *EZH2* expresszióra mRNS- és fehérje-szinten is megvizsgáltuk. *EZH2* mutációt hordozó primer FL szövetmintákon és különböző centrum germinativum eredetű B-sejtes lymphoma sejtvonalakat vizsgálva nem mutattunk ki különbséget az *EZH2* mRNS vagy fehérje expressziójában az *EZH2* mutáns és *EZH2* vad típusú esetek között (30. és 31. ábrák).



**30. ábra:** *EZH2* mRNS expresszió vizsgálata *EZH2* mutáns és vad típusú **A:** primer FL mintákban és **B:** B-sejtes sejtvonalakban. Kontrollként egészséges egyénekből gyűjtött tonsilláris B-sejteket, valamint a HRC57 és Nc-Nc benignus B-lymphoblastoid sejtvonalakat használtuk.

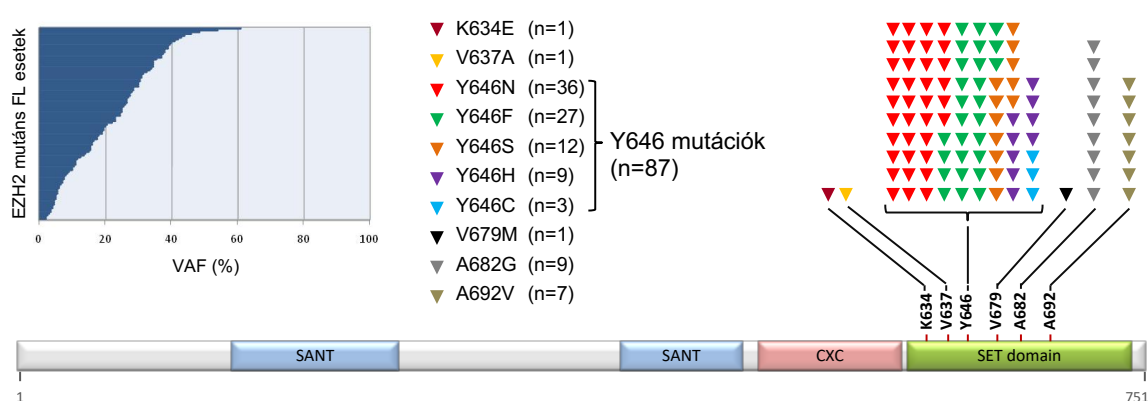
Az *EZH2* mutációk funkcionális hatását vizsgálva, az addigi egyetlen irodalmi adattal szemben eredményeink nem támasztották alá a mutáció lehetséges funkcióvesztéses jellegét: valamennyi esetben, az *EZH2* mutációs státusztól függetlenül, H3K27me3 expressziót mutattunk ki, amely az *EZH2* mutáns SU-DHL4 és SU-DHL6 sejtvonalakban fokozottabbnak bizonyult (31. ábra).



**31. ábra:** *EZH2* fehérje expresszió H3K27me3 expresszió meghatározása *EZH2* mutáns és vad típusú **A:** primer FL mintákban és **B:** sejtvonalakban. Az SU-DHL-4 és SU-DHL-6 sejtekben fokozott H3K27 trimetilációt detektáltunk.

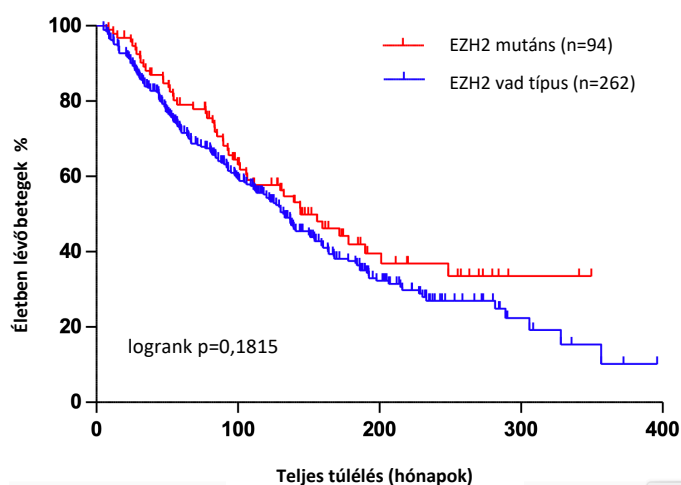
### V.2.3 *EZH2* mutációk vizsgálata új-generációs szekvenálással

Az *EZH2* mutációk komplexebb vizsgálatára nagy érzékenységű NGS vizsgálattal nyílt lehetőségünk. A korábbinál lényegesen magasabb arányban, a vizsgált betegek 27,5%-ában (101/366) azonosítottunk *EZH2* mutációt. Az azonosított mutációk döntő többsége az Y646 kodont érintő eltérés, amelyet az A682 és A692 kodonok mutációi követtek. Három, korábban nem azonosított, új *EZH2* variánst (K634E, V637A és V679M) is felfedeztünk. A mutációk VAF-ja 2% és 61% között változott. A 101 betegben azonosított 106 *EZH2* mutáció típusának és allélfrekvenciájának eloszlása a 32. ábrán látható.



**32. ábra:** A 101 betegben azonosított 106 *EZH2* mutáció allélfrekvenciájának (VAF) és típusának eloszlása 366 follicularis lymphomás beteg nyirokcsomó mintájának vizsgálata alapján. A kanonikus Y646, A682 és A692 eltérések mellett új mutációkat (K634E, V637A és V679M) is azonosítottunk.

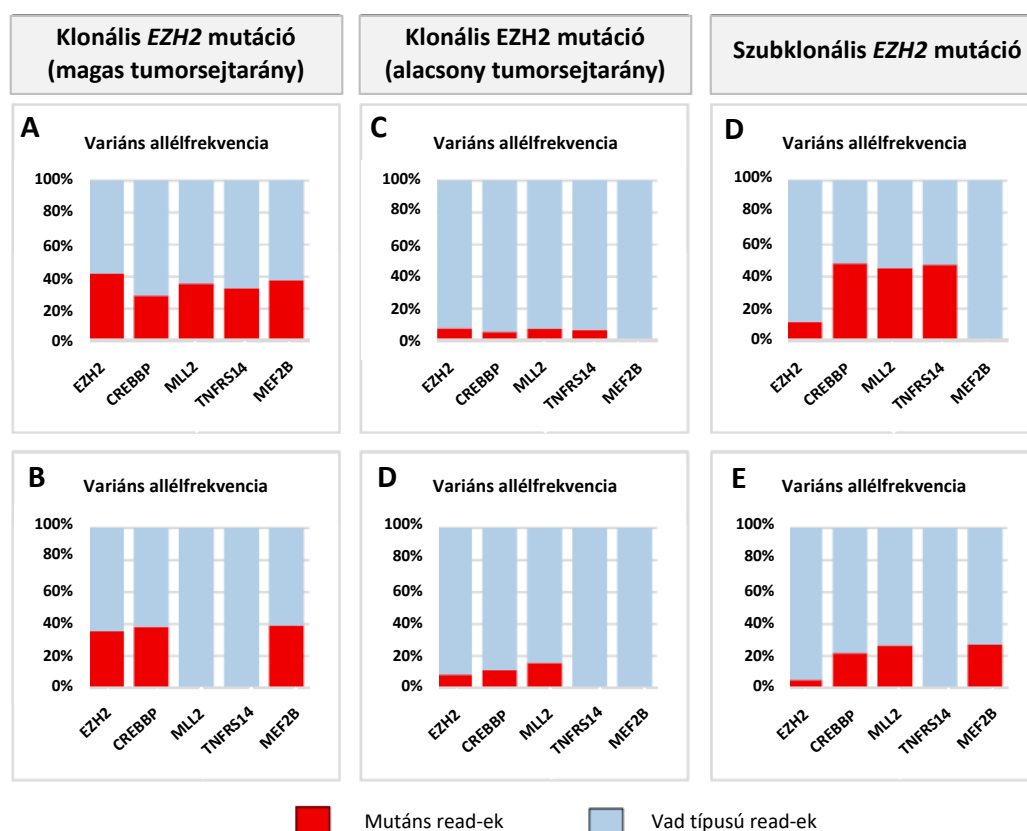
A szenzitívebb analízissel nyert adatokat megvizsgálva sem mutattunk ki összefüggést az *EZH2* mutációs státusz és a betegek teljes túlélése között (33. ábra).



**33. ábra:** Az *EZH2* mutációs státusz és a teljes túlélés összefüggése 366 follicularis lymphomás beteg esetében.

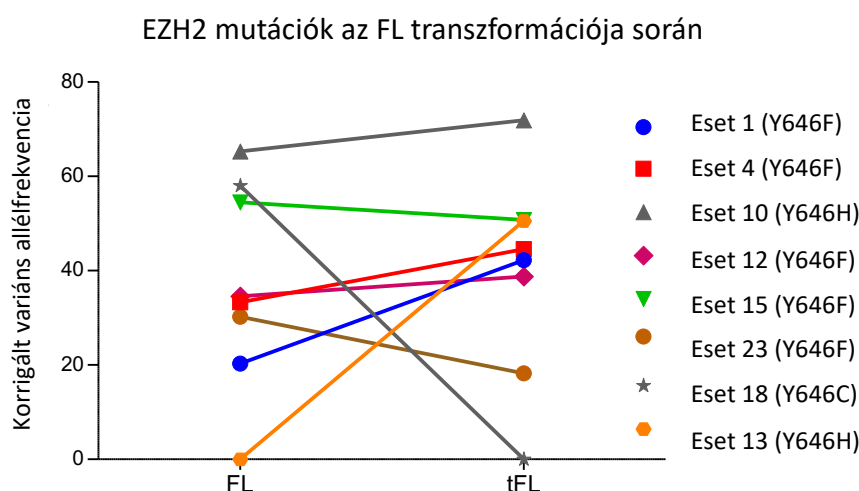


Az *EZH2* mutációk klonalitását tisztázandó, a széles tartományban (2-61%) megjelenő *EZH2* VAF értékeket további driver gének (*CREBBP*, *MLL2*, *TNFRSF14* és *MEF2B*) NGS-sel meghatározott VAF értékeivel vetettük össze 43 FL minta esetében. Ily módon képesek voltunk a valóban klonális *EZH2* mutációk azonosítására alacsony tumorsejtarány mellett is. A valamennyi driver gén esetében alacsony VAF-fal megjelenő mutációkat alacsony tumorsejtarány melletti klonális eltérésként kategorizáltuk, míg amikor az *EZH2* esetében mért alacsony VAF a további driver gén mutációinak magas értékével társult, az *EZH2* mutációt szubklonálisnak tekintettük. Eredményeink alapján az esetek többségében (81%, 35/43) az *EZH2* mutációk klonális genetikai eltéréseket képviselnek (34. ábra).



**34. ábra:** Klonalitás vizsgálata új-generációs szekvenálási adatok variáns allélfrekvenciájának értékelésével néhány reprezentatív eseten szemlélítve. Az *EZH2* mutációk klonalitását a *CREBBP*, *MLL2*, *TNFRSF14* és *MEF2B* gének VAF értékeinek összevetésével határoztuk meg. Ezzel a módszerrel az egyértelműen klonális *EZH2* variánsok (A és B) mellett sikerült elkülöníteni az alacsony tumorsejtarány okán szubklonálisnak tűnő, de klonális (C és D) és a további driver gének magasabb VAF értékéből következően valóban szubklonális *EZH2* mutációkat (E és F).

Vizsgáltuk továbbá az *EZH2* mutációk szerepét az FL progressziója és transzformációja során. A betegség diagnózisakor és relapszusakor meghatározott mutációs gyakoriságok között nem találtunk különbséget (diagnóziskor: 29%,  $n=70/23$ ; relapszuskor 24%,  $n=31/129$ ). A magas grádusú transzformációt vizsgálva a 33 FL-tFL mintapár 24,2%-ában (8/33) azonosítottunk *EZH2* mutációt. Hat esetben az FL és tFL mintában is kimutatható volt az *EZH2* mutáció, míg egy esetben a mutáció elvesztését figyeltük meg a tFL mintában, illetve egy esetben a transzformáció során jelent meg az *EZH2* mutáció (35. ábra). Összességében az *EZH2* mutációkat korai, a progresszió során stabil biomarkerként azonosítottuk, ami ideális célzott terápiás jelöltté teszi ezt az elérést.



**35. ábra:** Az *EZH2* mutációk tumorsejt aránnyal normalizált variáns allél frekvenciája a transzformáció során. Hat beteg esetén a follicularis lymphoma, valamint az azt követően kialakult transzformált follicularis lymphoma vizsgálata megegyező, klonális *EZH2* mutációt mutatott, míg egy-egy esetben a mutáció megjelent, valamint eltűnt a transzformáció során (13-as és 18-as beteg).

#### Follicularis lymphoma kapcsán tett kiemelt megfigyeléseink:

- Elsőként végeztük el az FL transzformációjának genom-szintű feltérképezését, amely során új mutációs célpontokat és evolúciós mechanizmusokat azonosítottunk.
- Genom szinten bizonyítottuk a közös progenitor klón elmélet relevanciáját a betegség progressziójában és transzformációjában.
- Elsőként határoztuk meg az *EZH2* mutációk valódi gyakoriságát, klinikai jelentőségét és a betegség klonális architektúrájában elfoglalt helyét, ami ideális terápiás célpontként definiálta a gént FL-ben.

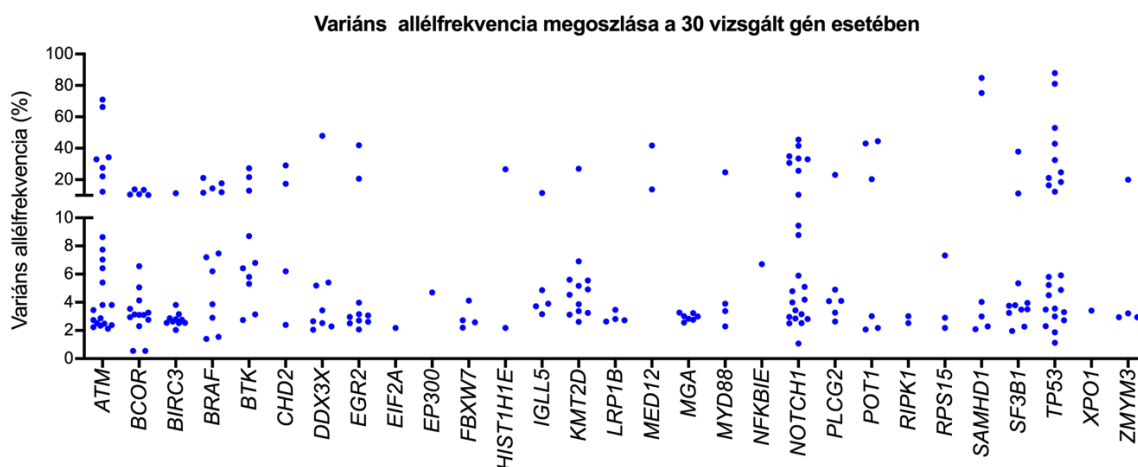
### V.3 Célzott terápia szelekciós nyomására kialakuló evolúciós folyamatok feltérképezése krónikus lymphocytás leukémiában

A CLL-t érintő tanulmányaink során elsősorban a betegség kezelésében az elmúlt években megjelent innovatív terápia, az ibrutinib hatását vizsgáltuk a betegség szubklonális architektúrájára időbeli és térbeli mutációs profilozás alkalmazásával, amely során jelentős szubklonális heterogenitást és dinamikus klonális szelekciót figyeltünk meg [203, 204].

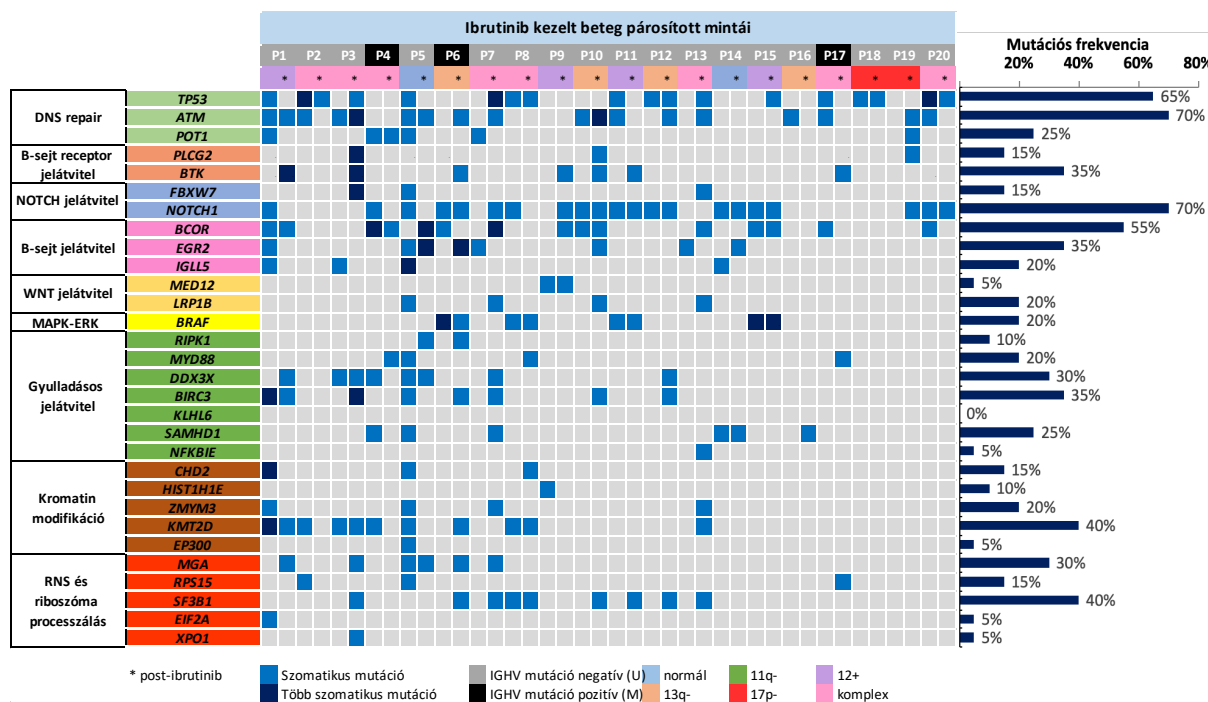
#### V.3.1 Ibrutinib indukálta klonális evolúció mintázatai CLL-ben

Húsz CLL-ben szenvedő beteg ibrutinib kezelés előtti és a kezelés során gyűjtött mintáinak NGS-sel történő analízise során az *ATM*, *BCOR*, *BIRC3*, *BRAF*, *BTK*, *CHD2*, *DDX3X*, *EGR2*, *EIF2A*, *EP300*, *FBXW7*, *HIST1H1E*, *IGLL5*, *KLHL6*, *MLL2*, *LRP1B*, *MED12*, *MGA*, *MYD88*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *PLCγ2*, *POT1*, *RIPK1*, *RPS15*, *SAMHD1*, *SF3B1*, *TP53*, *XPO1* és *ZMYM3* gének mutációinak időbeli alakulását vizsgálva az ibrutinib kezelés hatására kialakuló heterogén mutációs mintázatot azonosítottunk. A követési idő az NGS analízis idejében 22,5 hónap (tartomány: 3-34 hónap) volt.

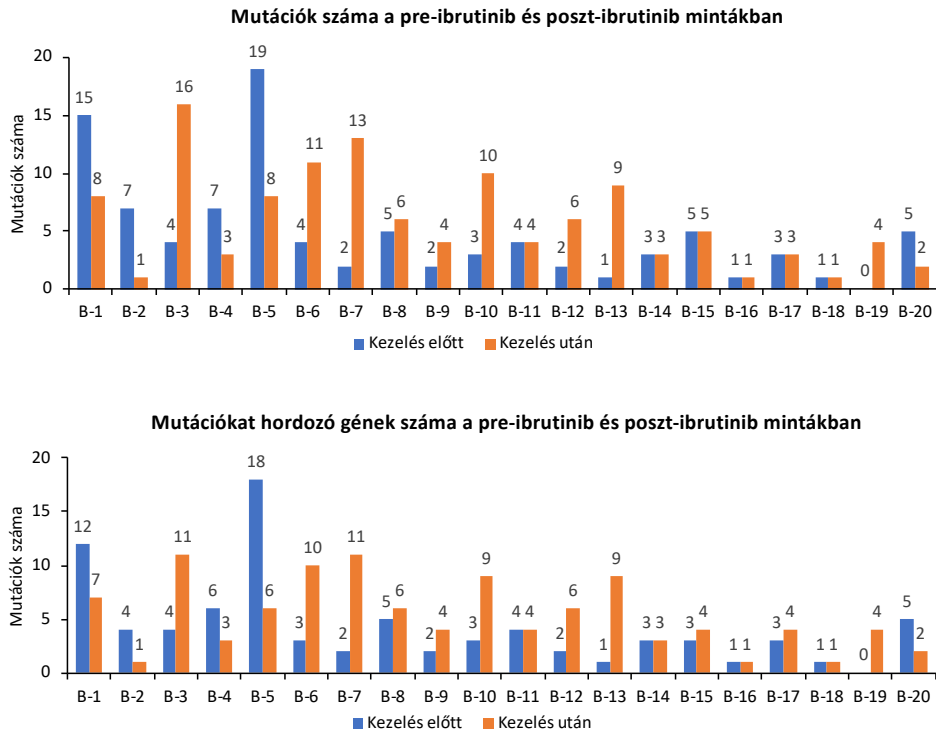
Az NGS analízis összesen 211 szomatikus variánst azonosított a 20 mintapár esetében, átlagosan 7500x szekvenálási mélység elérése mellett. A mutációk többsége (157/211) szubklonálisnak (VAF < 10%) bizonyult (36. ábra). Jelentős szubklonális heterogenitást észleltünk az egyes esetekben, esetenként átlagosan 5 (tartomány 0-19) mutációt detektálva, amelyek átlagosan 4 (0-18) gént érintettek (37. és 38. ábrák). A leggyakrabban mutációkat hordozó gének az alábbiak voltak: *NOTCH1* (70%, 14/20), *ATM* (70%, 14/20), *TP53* (65%, 13/20) és *BCOR* (55%, 11/20) (37. ábra).



**36. ábra:** Az új-generációs szekvenálással azonosított mutációk variáns allélfrekvenciáinak eloszlása.



**37. ábra:** A 20 ibrutinibbel kezelt beteg új-generációs szekvenálással történő analizisének áttekintő megjelenítése mutációs hőterkép formájában. Az ábra a betegek IGHV mutációs státuszáról, valamint a legfontosabb citogenetikai eltérések státuszáról is áttekintést nyújt, a 30 vizsgált célgén mutációs profilja, valamint az egyes gének mutációinak előfordulási gyakorisága mellett.



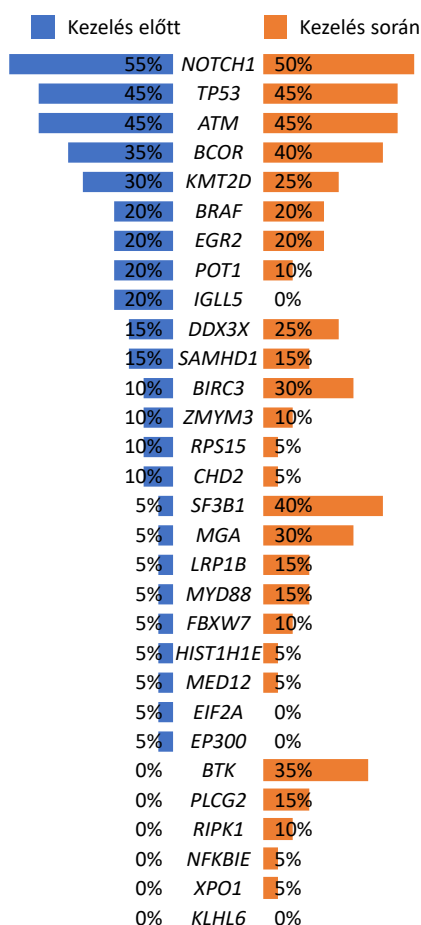
**38. ábra:** **A:** A detektált szomatikus mutációk száma, valamint **B:** a mutációk által érintett gének száma esetenként a kezelés előtti és a kezelés során gyűjtött mintákban.

Ugyanazon gént érintő többszörös mutációkat, azaz konvergens mutációs evolúciót (CME: „convergent mutation evolution”) [205] az analizált gének 40%-ában (12/30) mutattunk ki, 2-4 mutációt azonosítva az egyes gének esetében. Összességében CME-t a betegek 50%-ában (10/20) azonosítottuk, négy beteg esetében a pre- és poszt-ibrutinib mintákban egyaránt, három-három beteg esetében pedig a pre- vagy poszt-ibrutinib mintában dokumentáltuk ezt az eseményt.

A szomatikus mutációk időbeli alakulását elemezve megfigyeltük, hogy a poszt-ibrutinib minták enyhén magasabb mutációs terhelést mutattak (118 vs. 93 mutáció), átlagosan 5,9 mutációt (1-16) azonosítva a kezelés előtti (pre-ibrutinib) mintákban, szemben a poszt-ibrutinib mintákban dokumentált átlagos 4,7 (0-19) mutáció-számmal (38. ábra). A *NOTCH1*, *ATM*, *TP53* és *BCOR* voltak a pre- és poszt-ibrutinib mintákban egyaránt leggyakrabban mutációt hordozó gének (39. ábra). Az *IGLL5*, *EIF2A* és *EP300* mutációk eliminációját figyeltük meg a poszt-ibrutinib minták esetében, az alábbi gének esetében ugyanakkor a mutációk dúsulását figyeltük meg a kezelés során gyűjtött minták esetében: *SF3B1* (5% vs. 40%), *MGA* (5% vs. 30%), *BIRC3* (10% vs. 30%). A *BTK*, *PLCγ2*, *RIPK1*, *NFKBIE* és *XPO1* mutációk kizárólag a poszt-ibrutinib mintákban kerültek kimutatásra 35, 15, 10, 5 és 5%-os mutációs frekvenciával az egyes gének vonatkozásában (39. ábra).

A *TP53* mutációk magas gyakorisága a kezelés előtti és azt követő mintákban (45%) megfelel annak a ténynek, hogy az általunk vizsgált kohorsz több kezelésen átesett relabáló betegekből álló csoport. Korábban 196 CLL-es beteg *TP53* mutáció-analízise során demonstráltuk, hogy a betegség progressziójával a *TP53* mutációk gyakoriságának folyamatos, akár 50%-ot is elérő emelkedése figyelhető meg [206].

## A SZOMATIKUS MUTÁCIÓK IDŐBELI MEGJELENÉSE



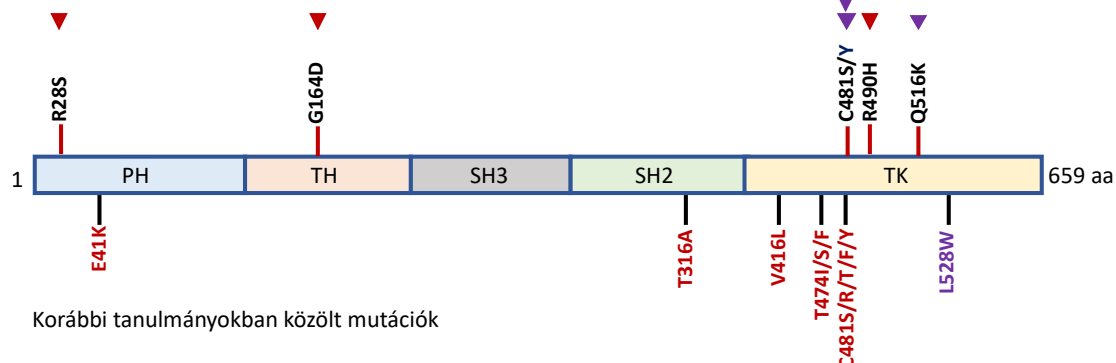
**39. ábra:** A vizsgált 30 célgén előfordulási gyakoriságának összehasonlítása a kezelés előtti és kezelés utáni minták esetén.

#### V.3.1.1 A BTK, PLCG2 és TP53 mutációk szubklonális dinamikája

Az ibrutinib rezisztenciával kapcsolatba hozható *BTK* vagy *PLCγ2* mutációkat a betegek 40%-ában (8/20), illetve 5%-ában (1/20) azonosítottunk, két esetben a *BTK* és *PLCγ2* mutációk együttes előfordulását figyeltük meg. A kanonikus *BTK* C481 és *PLCγ2* D993 mutációs forrópontokon kívül korábban nem ismert mutációkat is azonosítottunk a két génben: R28, G164, R490 és Q516 aminosavakat érintő variánsok a *BTK* génben, míg a F82, R694 és S1192 kodonokat érintő mutációk a *PLCγ2* génben felfedezett új variánsok voltak (40. és 41. ábrák). Az újonnan azonosított mutációk összesen négy betegben jelentek meg (betegenként 1-4 mutáció).

**BTK** (Chr. Xq22.1)

A tanulmányunkban azonosított mutációk

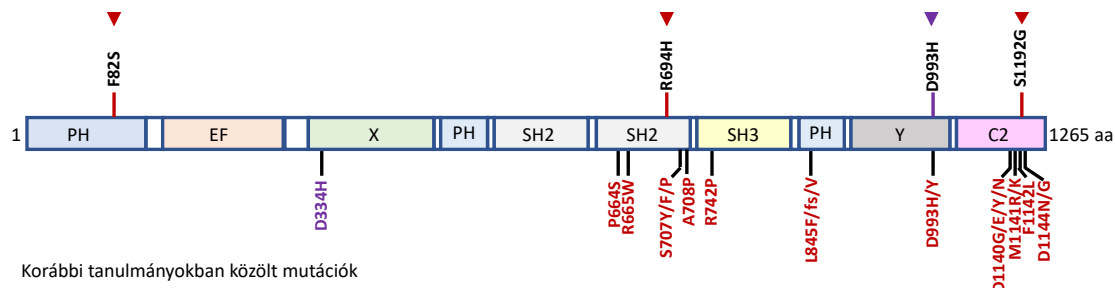


Korábbi tanulmányokban közölt mutációk

**40. ábra:** A BTK fehérje alegységeiben eddig leírt mutációk kiegészítve az általunk újonnan azonosított variánsokkal. A piros színnel jelölt variánsokat a betegek CLL mintáiban azonosítottuk, míg lila színnel jelöltük a Richter transzformáció során vett mintákból kimutatott mutációkat. A *BTK* R28S, G164D, R490H és Q516K mutációkat korábban nem azonosították a COSMIC adatbázis szerint.

**PLCG2** (Chr. 16q23.3)

A tanulmányunkban azonosított mutációk

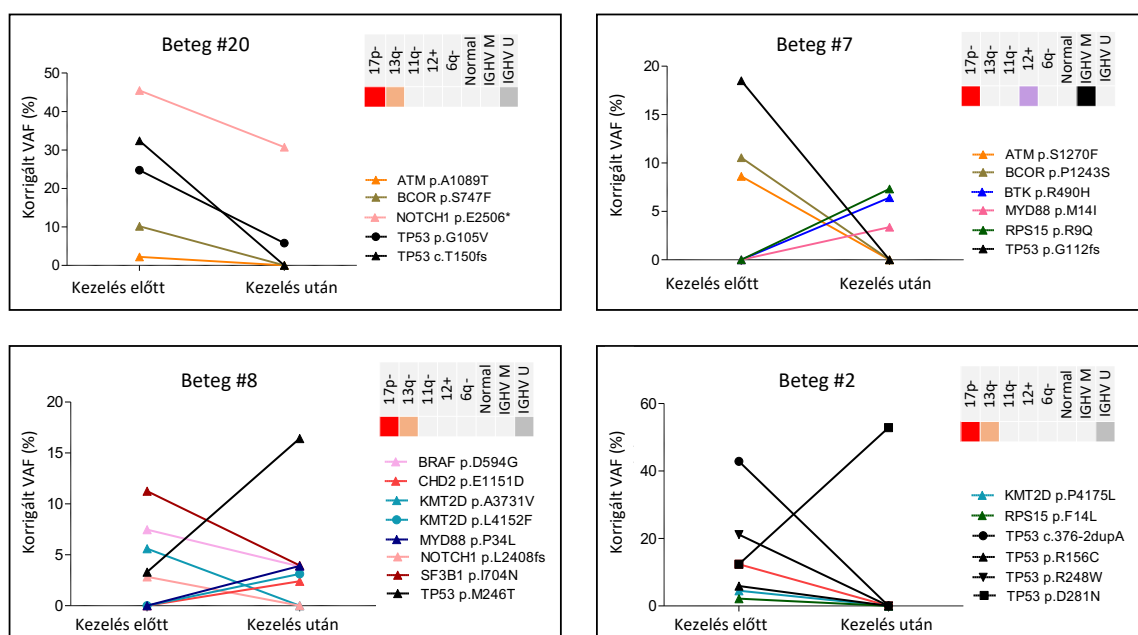


Korábbi tanulmányokban közölt mutációk

**41. ábra:** A PLCG2 fehérje alegységeiben eddig leírt mutációk kiegészítve az általunk újonnan azonosított variánsokkal. A piros színnel jelölt variánsokat a betegek CLL mintáiban azonosítottuk, míg lila színnel jelöltük a Richter transzformáció során vett mintákból kimutatott mutációkat. A *PLCγ2* F82S és S1192G mutációt korábban nem azonosították a COSMIC adatbázis szerint. A *PLCγ2* R694H variánst korábban két vastagbélrák mintában azonosították (COSM2693625), azonban CLL-ben tanulmányunk idején még nem írták le.

A *TP53* mutációk vonatkozásában a klonális evolúció különböző mintázatait figyeltük meg; bizonyos esetekben a *TP53* mutáns szubklón eltűnését azonosítottuk az ibrutinib terápia hatására, más esetekben a *TP53* mutáns szubklón térnyerését dokumentáltuk a gyógyszer szelekciós nyomásának hatására. Érdekes módon néhány esetben az eredeti *TP53* mutáció eliminációjával párhuzamosan újabb független *TP53* mutáns szubklón(ok) megjelenését figyeltük meg. A 42. ábrán ezen mintázatokat mutató esetekben megfigyelt klonális architektúra változásai láthatóak négy beteg példáján szemlélítve.

A *TP53* és *BTK* mutációk alternáló klonális dinamikáját írtuk le szinte valamennyi esetben, amely mindkét gén mutációját hordozta: a *BTK* mutációk megjelenését az ibrutinib kezelés során a *TP53* mutáns szubklón eliminációja kísérte valamennyi esetben (42. ábra, #B7 beteg). Ugyanakkor a *TP53* mutáns szubklónok expanziója kizárólag egy esetben volt megfigyelhető valamely *BTK* mutáció jelenlétében, és a kanonikus *BTK* C481 mutációt egyszer sem mutattuk ki *TP53* mutáció jelenlétében a poszt-ibrutinib mintákban.



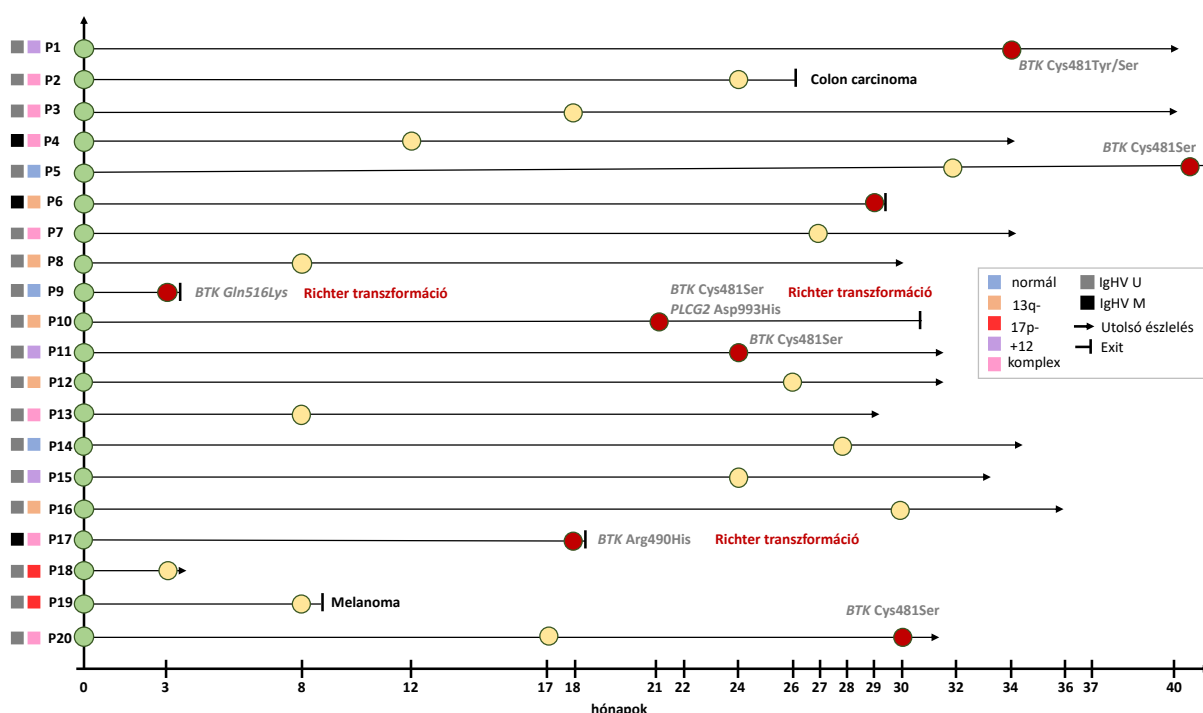
**42. ábra:** A szubklonális architektúra változásának ábrázolása négy beteg esetében. Konvergens mutációs evolúciót figyelhetünk meg a 2-es és 20-as számú betegek esetében, akiknél többszörös *TP53* mutációk megjelenése volt kimutatható. A *TP53* mutációk variáns allél frekvenciájának expanziója és eliminációja egyaránt megfigyelhető volt az ibrutinib kezelés során.

A nyers szekvenálási adatok elérhetők a European Nucleotide Archive honlapján (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB32120, Secondary Accession: ERP114759).



### V.3.2 A betegcsoport klinikai követése

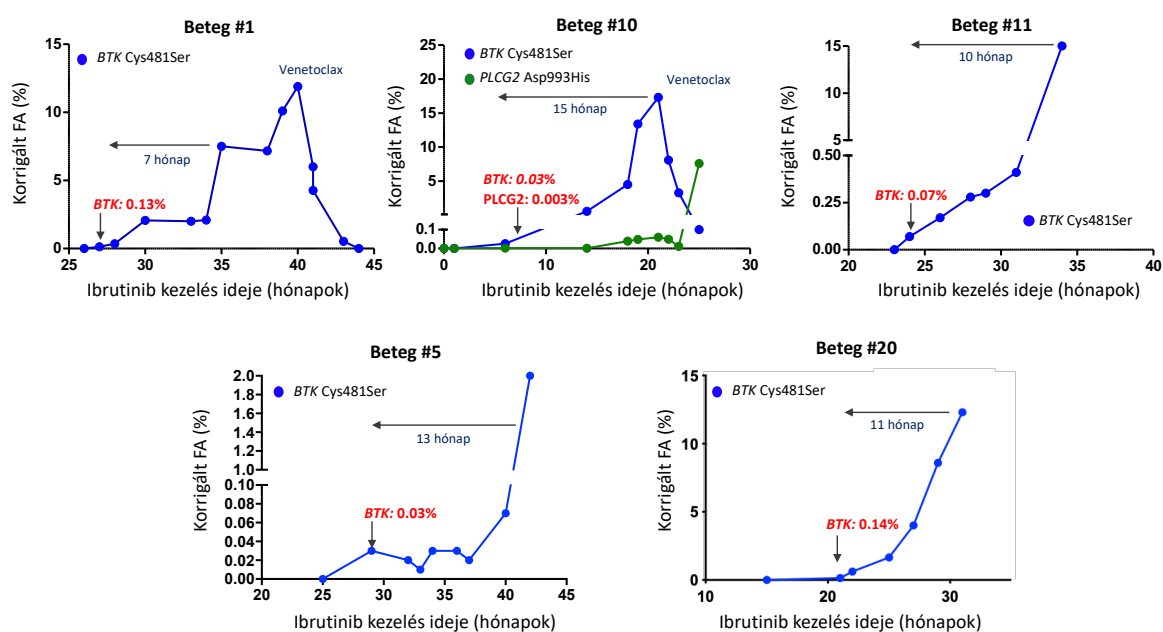
A betegcsoport követési ideje a fentebb ismertetett NGS analízis idejében 22,5 hónap (tartomány: 3-34 hónap) volt. A mutáció-analízist követően eltelt idővel összesen medián 36,5 hónap (3-43 hónap) elteltével a betegek 65%-a (13/20) parciális vagy komplett remisszióban még ibrutinib kezelés alatt állt. Három beteg (#9, #10 és #17) esetében, akik *BTK* mutációt hordoztak, Richter transzformáció alakult ki és a követés 4., 30., valamint 18. hónapjában elhunytak. A #9 és #17-es számú betegben az újonnan felfedezett *BTK* mutációk kapcsolatát mutattuk ki a betegség progressziójával (43. ábra). Két beteg (#2 és #19) esetében szekunder daganat következtében történt az elhalálozás. Az NGS analízishez történő mintagyűjtést követően 12, illetve 15 hónappal később az #5 és #20 betegekben is kimutattuk az ibrutinib rezisztenciával társuló *BTK* C481S mutációt digitális droplet PCR alkalmazásával. A betegcsoportunkban valamennyi *BTK* és/vagy *PLCγ2* mutációt hordozó beteg laboratóriumi (folyamatosan emelkedő fehérvérsejtszám) vagy klinikai progresszió jeleit mutatta. *BTK* és/vagy *PLCG2* mutációk hiányában nem figyeltünk meg terápiás kudarcot és betegség progressziót.



**43. ábra:** A 20 ibrutinibbel kezelt betegen végzett molekuláris és citogenetikai vizsgálatok eredményét ábrázoló idővonal. Piros körrel jelöltük a progresszió időpontjában új-generációs szekvenálással azonosított *BTK*, valamint *PLCγ2* mutációkat. Rövidítések: +12: 12-es kromoszóma triszómiája; 13q-: del(13q); 17p-: del(17p); IGHV M: IGHV mutáció pozitív; IGHV U: IGHV mutáció negatív; komplex: komplex karyotípus.

### V.3.3 *BTK* rezisztencia mutációk szenzitív nyomonkövetése CLL-ben

Sorozatminták nagy szenzitivitású (0,01%) ddPCR-rel való vizsgálata által lehetőségünk nyílt a *BTK* és *PLCγ2* mutációk megjelenésének legkorábbi időpontját azonosítani a betegség klonális fejlődése során. A 44. ábrán bemutatott öt beteg esetében meghatároztuk a legkorábbi időpontot, amikor a *BTK/PLCγ2* mutációk szelektív előnyre tettek szert. Ezen mutációk a klinikai relapszust átlagosan 10,5 hónappal (7-15 hónap) megelőzően jelentek meg alacsony allélfrekvenciával. Az #1 és #10 számú beteg esetében az ibrutinib rezisztencia kialakulását követően alkalmazott BCL2 gátlószer venetoclax hatására megfigyelt *BTK* mutáns szubklón redukcióját is dokumentáltuk (44. ábra). A #10 számú beteg esetében fedeztük fel a térbeli konvergens evolúció jelentőségét a betegség evolúciója során (lásd V.3.4. fejezet).



**44. ábra:** A *BTK* Cys481Ser és *PLCG2* Asp993His mutációk követése digitális droplet PCR módszerével öt beteg esetében. A *BTK* vagy *PLCγ2* gének mutációi átlagosan a klinikai relapszus előtt 10,5 hónappal (tartomány 7-15) jelentek meg a betegek keringésében. Az #1 és #10 számú betegek esetén a venetoclax kezelés hatására bekövetkező variáns allél frekvencia változást is ábrázoltuk a *BTK* és *PLCγ2* mutációk esetében. Rövidítések: FA: frakcionális abundancia.

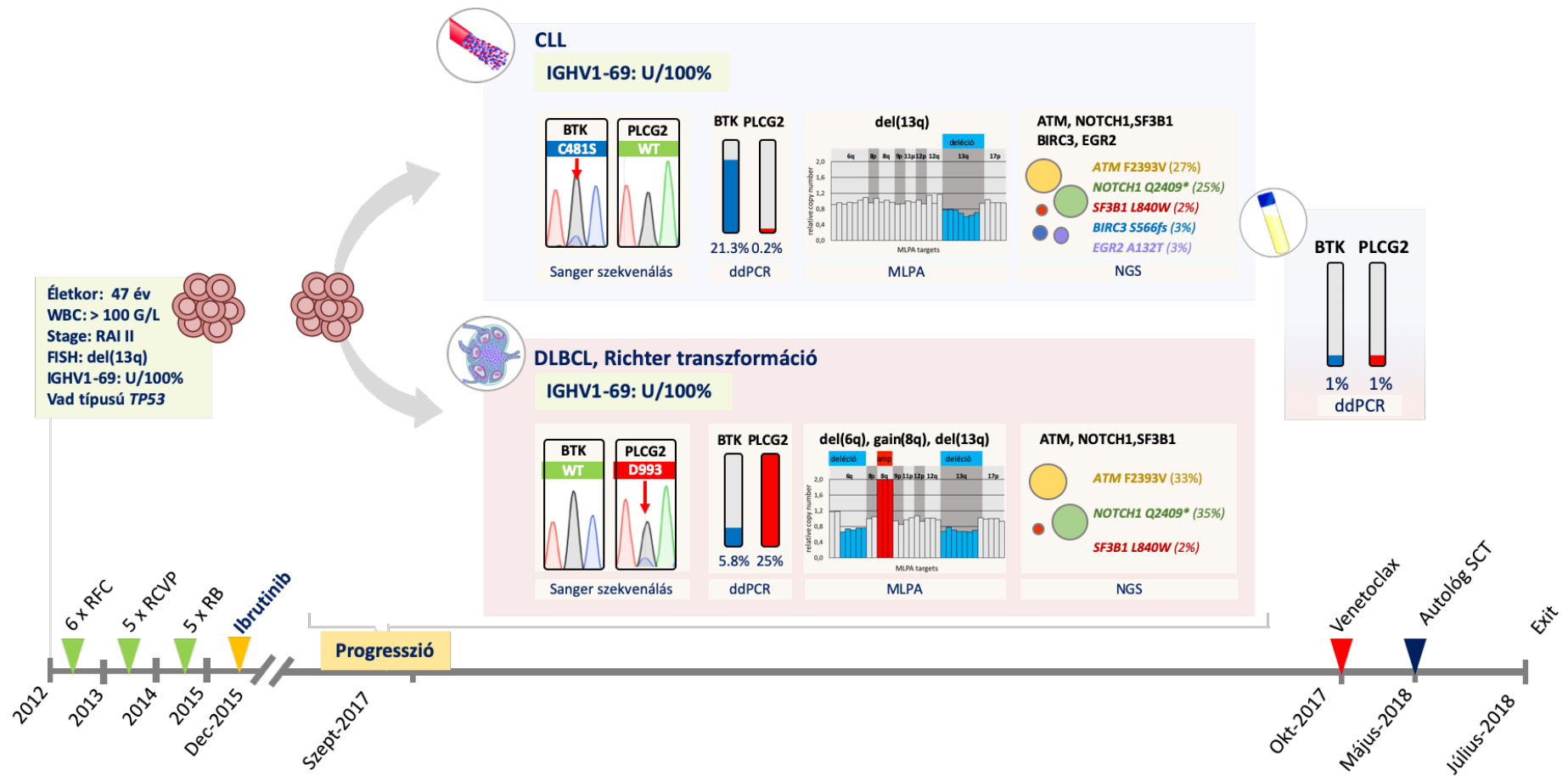
### V.3.4 Térbeli szubklonális heterogenitás és konvergens evolúció azonosítása CLL-ben

Átfogó genetikai vizsgálatokat végeztünk egy a betegség diagnózisakor 47 éves férfi beteg több mint tíz különböző időpontban és anatómiai lokalizációban gyűjtött mintájának esetében. A három vonalbeli kemoimmuno-terápia kudarcát követő ibrutinib-, majd azt követő venetoclax kezelés alatt lezajló klonális változásokat dokumentáltuk a beteg perifériás vér-, csontvelő- és folyadék biopsziás mintáiban (45. ábra). Az ibrutinib-kezelés 21. hónapjában kialakuló rezisztencia kapcsán végzett szövettani vizsgálat DLBCL-be történő Richter transzformációt igazolt, amely klonális kapcsoltságát a kezdeti CLL betegséggel az *IGHV* gén mutáció-analízisével igazoltuk, identikus IGHV1-69 génszakaszt és kedvezőtlen prognózist előrejelző [69] negatív mutációs státuszt felfedve. Az ibrutinib kudarcot követően alkalmazott venetoclax kezelésre adott rövid válasz után a beteg ismét progrediált, majd az intenzív mentő kemoterápia és autológ HSCT-t követően hét hónappal elhunyt.

Az ibrutinib rezisztencia dokumentálásának idejében a perifériás vérben a kanonikus *BTK* C481S mutációt azonosítottuk Sanger szekvenálással, míg érdekes módon a nyirokcsomó mintában az ugyancsak ibrutinib rezisztenciával társuló *PLCγ2* D993H mutációt mutattuk ki vad típusú *BTK* génszekvencia mellett, a térbeli konvergens evolúció első esetét leírva CLL-ben [204]. Nagy érzékenységű NGS eljárással vizsgálva a nyirokcsomó mintában domináns *PLCγ2* D993H mutáció mellett minor szubklónként a *BTK* C481S mutációt is kimutattuk, míg a perifériás vérben a *PLCγ2* mutáció e vizsgálatlal sem volt kimutatható (45. ábra). A térbeli heterogenitást vizsgálva, mindkét szóban forgó mutációt sikeresen mutattuk ki a beteg folyadék biopsziás, keringő sejtmentes DNS (ccfDNS) mintájából ddPCR vizsgálat segítségével.

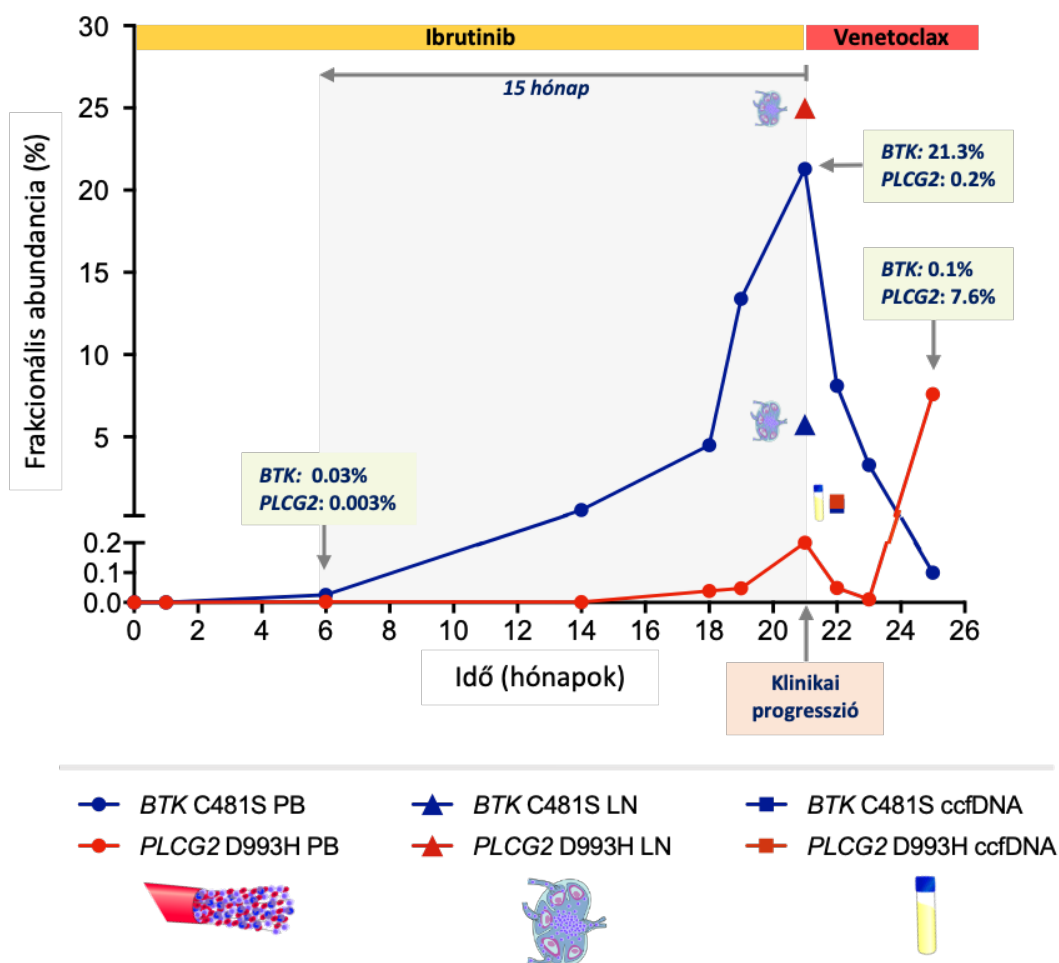
A perifériás vér és nyirokcsomó között megfigyelt heterogenitás további analízise során az *ATM*, *BCOR*, *BIRC3*, *EGR2*, *NOTCH1*, *NFKBIE*, *MYD88*, *SF3B1* és *TP53* gének mutációs státuszát tártuk fel NGS vizsgálatlall. A mindkét kompartmentumban kimutatott *ATM* F2393V, *NOTCH1* Q2409\* és *SF3B1* L840W mutációk mellett a *BIRC3* S566fs és az *EGR2* A132T mutációk kizárólag a perifériás vérben jelentek meg (45. ábra). A további gének vad típusúnak bizonyultak.

A betegség progressziója során MLPA segítségével a kópiaszám-eltérések tekintetében is klonális evolúciót figyeltünk meg: a kezdeti CLL-ben kimutatható del(13q) mellett a Richter transzformáció során a 6q régió delécióját, valamint a 8q régió amplifikációját azonosítottuk (45. ábra).



**45. ábra:** Az ibrutinib rezisztencia kialakulását kísérő klinikai események és genetikai változások, a genetikai eltérések térbeli heterogenitásának kiemelésével. Rövidítések: ddPCR: digitális droplet PCR; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; MLPA: multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció; RFC: rituximab-fludarabin-ciklofoszfamid; RCVP: rituximab-ciklofoszfamid-vinkrisztin-prednizolon; RB: rituximab-bendamustin; SCT: hematopoietikus őssejt transzplantáció.

A *BTK* és *PLC $\gamma$ 2* mutáns szubklónok időbeli és térbeli klonális dinamikáját tovább vizsgálva, tíz különböző perifériás vérminta, valamint a nyirokcsomói minta esetében követtük nyomon ddPCR eljárással a két gén korábban azonosított variánsait. Az ibrutinib kezelés megkezdése előtt a *BTK* és *PLC $\gamma$ 2* mutációk nem voltak kimutathatók, mindazonáltal a klinikai relapszust 15 hónappal megelőzően alacsony allélfrekvenciával (*BTK* C481S: 0,03% és *PLC $\gamma$ 2* D993H: 0,003%) megjelentek a beteg keringésében a kezelés 6. hónapjában (46. ábra). Az ibrutinib szelekciós nyomásának hatására a két szubklón fokozatos expanszióját figyeltük meg. Az ibrutinib terápiás kudarc idejében a perifériás vérben a *BTK* C481S, míg a nyirokcsomóban a *PLC $\gamma$ 2* D993H szubklón volt domináns (46. ábra). Érdekes módon a *BTK* és *PLC $\gamma$ 2* mutáns szubklónok különböző szenzitivitást mutattak az alkalmazott venetoclax kezelésre: a vérben domináns *BTK* C481S szubklón eliminációjával párhuzamosan a korábban a nyirokcsomóban domináns *PLC $\gamma$ 2* D993H szubklón expanszióját figyeltük meg a perifériás vérben, ami a betegség progressziójához és a beteg halálához vezetett, felhívva a figyelmet a nagy érzékenységű, több anatómiai lokalizációt is magába foglaló genetikai analízis jelentőségére a betegség progressziójáért felelős genetikai léziók megfelelő feltérképezésében [204].



**46. ábra:** A kimutatott *BTK* és *PLC $\gamma$ 2* mutációk variáns allél frekvenciájának változása a kórlefolyás során. (A) A *BTK* p.C481S és *PLC $\gamma$ 2* p.D993H mutációk nyomonkövetése digitális droplet PCR-rel a perifériás vér, nyirokcsomó, valamint keringő sejtmentes DNS (ccfDNS) mintákban ibrutinib, majd venetoclax kezelés mellett. A mutációs terhet a variáns allél frekvencia (frakcionális abundancia) jeleníti meg, mely a mutáns DNS molekulák arányát fejezi ki a mutáns és vad-típusú molekulák összegéhez viszonyítva. A variáns allél frekvenciát a CLL sejt arányra normalizálva adtuk meg az áramlási citometriás mérés eredménye alapján. Rövidítések: ccfDNA: keringő sejtmentes DNS; ddPCR: digitális droplet PCR.

#### Krónikus lymphocytás leukémia kapcsán tett kiemelt megfigyeléseink:

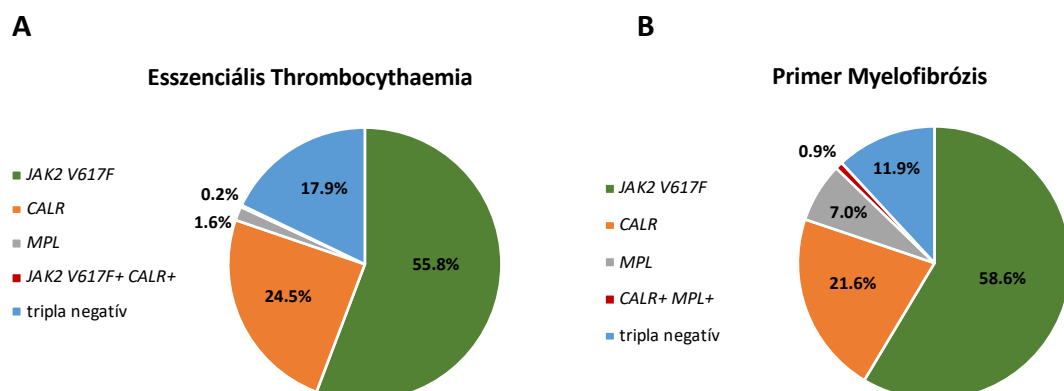
- Elsőként végeztük el klinikai tanulmányon kívüli beteganyag esetében az ibrutinib kezelés hatására kialakuló klonális evolúció feltérképezését valamennyi CLL-ben ismert célgén kontextusában.
- Új, az ibrutinib rezisztenciával kapcsolatba hozható *BTK* és *PLC $\gamma$ 2* mutációkat fedeztünk fel.
- Elsőként írtuk le a térbeli konvergens evolúció jelenségét CLL-ben.

## V.4 Driver mutációk mennyiségi feltérképezése és fehérje-szintű kimutatása Philadelphia kromoszóma negatív krónikus myeloproliferatív neopláziákban

A Philadelphia kromoszóma negatív krónikus myeloproliferatív neopláziákban végzett vizsgálataink során nagyszámú hazai betegcsoport esetében végeztük el a *JAK2*, *CALR* és *MPL* gének mutáció-analízisét, amely során új összefüggéseket azonosítottunk a mutáns allélterhelés és különböző klinikai paraméterek között, új *CALR* mutációkat fedeztünk fel, valamint kidolgoztunk egy eljárást a *CALR* mutációk fehérje-szintű mennyiségi kimutatására [207, 208].

### V.4.1 A vizsgált Ph- MPN betegcsoport driver mutációs profilja

A *JAK2* V617F, *CALR* és *MPL* driver mutációk analízisét 425 ET és 227 PMF esetben végeztük el. ET-ben a driver mutációk megoszlása a következőképpen alakult: *JAK2* V617F mutáció az esetek 55,8%-ában, *CALR* mutáció a betegek 24,5%-ában igazolódott, míg *MPL* mutációt (W515A/K/L/R) a betegek 1,6%-hordozott. Egy esetben (0,2%) figyeltük meg a *JAK2* V617F és *CALR* mutációk együttes előfordulását, míg a betegek 17,9%-ában egyetlen driver gén mutációt sem figyeltünk meg (47.A ábra). PMF-ben a driver mutációk tekintetében az alábbi megfigyeléseket tettük: az esetek 58,6%-ában *JAK2* V617F mutáció volt azonosítható, *CALR* mutáció az esetek 21,6%-ában volt kimutatható, míg *MPL* gént érintő eltéréseket a betegek 7%-ában detektáltunk (47.B ábra). A PMF esetek 11,9%-a bizonyult tripla negatívnak (47.B ábra).

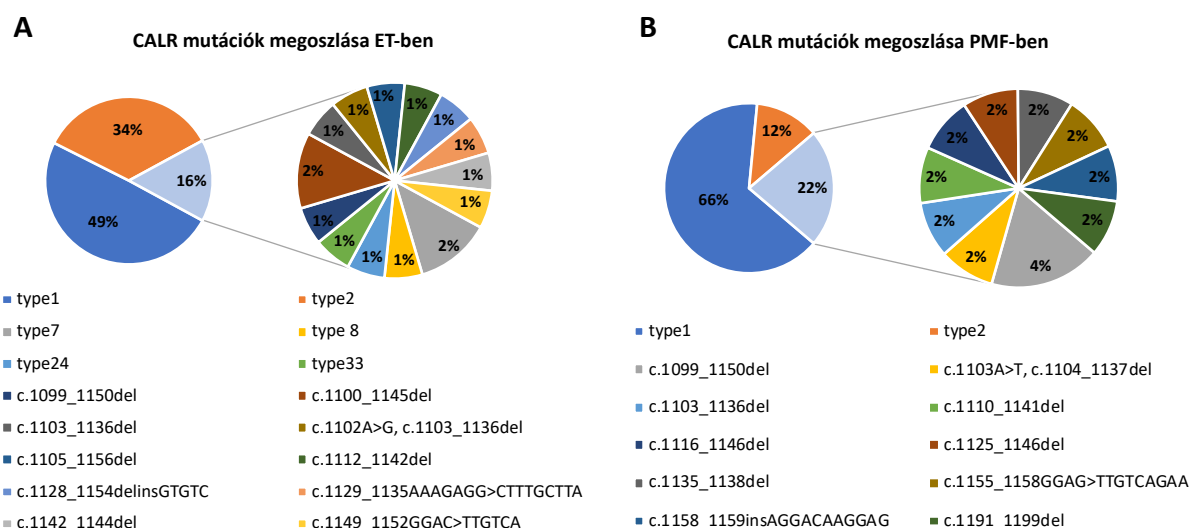


**47. ábra:** A 652 Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziában szenvedő beteg mutációs profilja **A:** esszenciális thrombocythemia (n=425) és **B:** primer myelofibrózis (n=227) esetében. (Forrás: Gángó és mtsai., *Leukemia Research* 2018)

#### V.4.1.1 Calreticulin mutációk megoszlása

Összesen 24-féle *CALR* mutációt mutattunk ki a betegcsoportban, amelyek közül 12 új, korábban még nem azonosított eltérésnek bizonyult. A korábban már ismert mutációk mellett ún. 1-es típus-szerű, 2-es típus-szerű, ritka in-frame deléciós mutációkat és egyéb ritka mutációkat is azonosítottunk (7. táblázat).

Az ET és PMF eseteket összehasonlítva a *CALR* mutáció-típusok megoszlása eltérőnek bizonyult. PMF-ben az 1-es és 2-es típusú *CALR* mutációk gyakorisága szignifikánsan magasabbnak adódott az ET esetekhez képest (66% és 12% PMF-ben vs. 49% és 34% ET-ben,  $p=0,007$ ) (48. ábra). Az 1-es típus-szerű és 2-es típus-szerű mutációk megoszlása hasonlóan bizonyult a két entitás között: PMF-ben 75% vs. 18% az 1-es típus-szerű mutációk tekintetében, míg ET-ben 60% vs. 37% a 2-es típus-szerű mutációk tekintetében ( $p=0,020$ ).



**48. ábra:** Az azonosított Calreticulin mutációk típusonkénti megoszlása **A:** esszenciális thrombocythaemia (n=105) és **B:** primer myelofibrózis (n=51) esetében. Rövidítések: ET: esszenciális thrombocythaemia; PMF: primer myelofibrózis. (Forrás: Gángó és mtsai., *Leukemia Research* 2018)



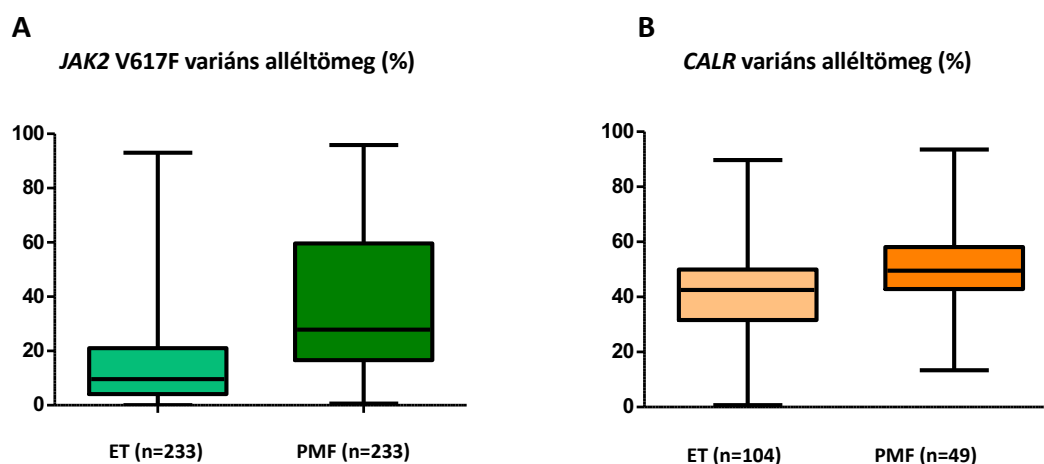
7. táblázat: A 156 betegben azonosított 24-féle Calreticulin mutáció típusa és hatásuk a fehérjeszerkezetre.

Nukleotid változás	Típus	Aminosav változás	Fehérje	Kategória	Mely MPN
c.1092_1143del	1-es típus	L367fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET, PMF
c.1099_1150del	új	L367fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET, PMF
c.1100_1145del	COSM2270995	L367fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1102_1153del	7-es típus	K368fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRLRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1103_1136del	COSM3355755	K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET, PMF
c.1102A>G, C1103_1136del	új	K368E+K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1103A>T, C1104_1137del	új	K368M+ E369fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	PMF
c.1105_1156del	új	E369fs*45	AAEKQMKDKQDEEQRLRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1104_1137del	8-as típus	E369fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1110_1141del	új	E371sf*6	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEGRGQGG-	egyéb	PMF
c.1112_1142del	COSM5703407	E371fs*49	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	ET
c.1116_1146del	COSM3733222	D373fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEERTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	PMF
c.1120_1138del	24-es típus	K374fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDRRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	ET
c.1128_1154delinsGTGTC	új	K375fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	ET
c.1125_1146del	COSM3734993	K375fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	PMF
c.1129_1135AAAGAGG>CTTT	új	K377fs*54	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRLCLRRRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	ET
c.1135_1138del	új	E379fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEERRQRTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	egyéb	PMF
c.1149_1152GGACTTGTC	új	E383fs*45	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDACQRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	2-es típus-szerű	ET
c.1154_1155insTTGTC	2-es típus	K385fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEENCRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	2-es típus-szerű	ET, PMF
c.1155_1158GGAG>TTGTCAG	új	K385fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEENCQKRRRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	2-es típus-szerű	PMF
c.1154_1155insATGTC	33-as típus	E385fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEKCRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	2-es típus-szerű	ET
c.1185_1159insAGGACAAGG, új	új	D387fs*44	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEKERTRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPTSCREACLOGWTEA-	2-es típus-szerű	PMF
c.1142_1144del	új	E381del	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEKEDDEDKDEDEEEDKEEEDVEDVPGQAKDEL-	in-frame	ET
c.1191_1199del	COSM5715390	E398_D400del	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEKEDDEDKDEDEEEDKEEEDVEDVPGQAKDEL-	in-frame	PMF
Referencia szekvencia			AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDKKRKEEEDAEKEDDEDKDEDEEEDKEEEDVEDVPGQAKDEL-		
Negatívan töltött szakaszok			I II III		

Magyarázat: A negatív töltéssel rendelkező aminosavakat piros, a pozitív töltéssel rendelkezőket kék színekkel jelöltük. A negatív töltésű aminosav-szekvenciák a calreticulin fehérje I-es, II-es és III-as régióit jelölik, melyek deléciói alapján osztályozhatók a *CALR* gént érintő mutációk. A deletált szakaszok számától függően 1-es típus-szerű (II-es és III-as szakasz deletált), 2-es típus-szerű (mindhárom szakasz deletált) és egyéb (III-as szakasz deletált) mutációkat különíthetünk el. A mutált C-terminális végén elhelyezkedő 36 bázispárnyi konszenzus szekvenciát aláhúzással jelöltük. Rövidítések: ET: *esszenciális thrombocythaemia*, PMF: *primer myelofibrózis*. (Forrás: Gángó és mtsai., *Leukemia Research* 2018)

#### V.4.2 *JAK2* V617F és *CALR* mutációk mennyiségi meghatározása ET-ben és PMF-ben

A *JAK2* V617F és *CALR* mutációk DNS-szintű mennyiségi analízisét 425 ET és 227 PMF esetben végeztük el, allélspecifikus RQ-PCR, illetve fragmenshossz-analízis alkalmazásával. Az alacsony mutációs gyakoriság, valamint a kimutatáshoz alkalmazott módszer limitációja miatt az *MPL* mutációk esetében volt lehetőségünk kvantitatív analízis elvégzésére. A *JAK2* V617F és *CALR* mutáns alléltömeg is szignifikánsan magasabbnak bizonyult PMF-ben, mint ET-ben (*JAK2* V617F: 31,4% vs. 9,7%,  $p < 0,001$ ; *CALR*: 49,6% vs. 42,5%,  $p < 0,001$ ) (49. ábra).



**49. ábra:** A: A *JAK2* V617F és B: *CALR* mutációk variáns allélfrekvenciájának megoszlása esszenciális thrombocythaemia és primer myelofibrózis esetében. Rövidítések: ET: esszenciális thrombocythaemia; PMF: primer myelofibrózis. (Forrás: Gángó és mtsai., *Leukemia Research* 2018)

##### V.4.2.1 *JAK2* V617F VAF összefüggése a klinikai paraméterekkel

A klinikai adatokkal való összehasonlítás céljából az ET és PMF betegcsoportokat a *JAK2* V617F VAF medián értéke mentén alacsony és magas alléltömeggel bíró csoportokra osztottuk. A klinikai és laboratóriumi paraméterenként változó VAF medián érték magyarázata az, hogy nem minden beteg esetében állt rendelkezésünkre valamennyi klinikai paraméter.

A *JAK2* V617F mutáns alléltömeg szignifikánsabban magasabbnak bizonyult azon ET-s betegek esetében, akik thrombotikus eseményeken estek át, szemben a thrombotikus eseményeken át nem esett társaiknál (32% vs. 14%,  $p = 0,02$ ). Továbbá, a magasabb *JAK2* mutáns alléltömeg ET-ben szignifikáns összefüggést mutatott a magasabb szérum LDH-val (403 vs. 360 NE/l,  $p = 0,03$ ), magasabb fehérvérsejt-számmal (10,8 vs. 9,6 G/l,  $p = 0,04$ ) és magasabb thrombocyta-számmal (814 vs. 695,5 G/l,  $p = 0,004$ ). Valamennyi vizsgált paraméter

a 8. táblázatban látható összefoglalva. A PMF esetében nem figyeltünk meg szignifikáns összefüggést a klinikai/laboratóriumi paraméterek, valamint a *JAK2* mutáns alléltömeg között.

**8. táblázat:** A *JAK2* V617F mutáns alléltömeg összefüggése a legfontosabb laboratóriumi és klinikai paraméterekkel esszenciális thrombocythaemia és primer myelofibrózis esetében




<i>JAK2</i> V617F mutáns alléltömeg	ET n=233			PMF n=133		
	< medián	> medián	mediánérték (%)	< medián	> medián	mediánérték (%)
Életkor diagnóziskor, év medián (tartomány)	60,5 (23-88)	63 (18-89)	9,7	66 (40-87)	68 (25-85)	31,4
	<i>P</i> =0,21			<i>P</i> =0,45		
Hemoglobin, g/dl, medián (tartomány)	13,8 (7,3-18,8)	13,7 (6,2-19,2)	9,2	11,6 (4,2-16)	10,6 (7,1-19,7)	26,4
	<i>P</i> =0,51			<i>P</i> =0,58		
Fehérvérszám, G/L, medián (tartomány)	9,6 (3,7-25,5)	10,8 (6,1-22,2)	9,2	13,4 (0,5-86)	12,9 (6,5-54)	26,2
	<i>P</i> =0,04			<i>P</i> =0,58		
TCT szám, G/L, medián (tartomány)	695,5 (405-1839)	814 (312-2224)	9,2	368 (27-1776)	324 (53-1750)	26,4
	<i>P</i> =0,004			<i>P</i> =0,59		
Szérum LDH, IU/L, medián (tartomány)	360 (205-1310)	403 (126-1314)	9,6	685 (280-2344)	685,5 (257-2384)	26,5
	<i>P</i> =0,03			<i>P</i> =0,79		
Thrombotikus események - diagnózis előtt (esetszám, %)	11/62 (18%)	15/62 (24%)	9,7	Nem történt adatgyűjtés		
	<i>P</i> =0,51					
Thrombotikus események - diagnózist követően (esetszám, %)	9/65 (14%)	21/65 (32%)	9,6	3/26 (12%)	5/27 (19%)	26,2
	<i>P</i> =0,02			<i>P</i> =0,70		
AML-transzformáció (esetszám, %)	0/82 (0%)	2/83 (2%)	9,3	3/27 (11%)	1/27 (4%)	32,6
	<i>P</i> =0,50			<i>P</i> =0,61		
MF-transzformáció (esetszám, %)	2/64 (3%)	4/64 (6%)	9,6	-		
	<i>P</i> =0,68					
Cytoreductív terápia (esetszám, %)	48/59 (81%)	51/60 (85%)	9,3	20/23 (87%)	21/23 (91%)	29,3
	<i>P</i> =0,63			<i>P</i> =1,00		

Megjegyzés: A medián értékek különbözősége abból adódik, hogy nem minden beteg esetében volt minden paraméter elérhető, így ezen betegek variáns allélfrekvencia adatait nem vettük számításba a medián érték meghatározása során. (Forrás: Gángó és mtsai., *Leukemia Research* 2018)

#### V.4.2.2 *CALR* variáns allélfrekvencia és a klinikai paraméterek összefüggése

A *JAK2* V617F esetében leírtakkal analóg módon, a klinikai adatokkal való összehasonlítás céljából az ET és PMF betegcsoportokat a *CALR* mutáns alléltömeg mediánértéke mentén alacsony és magas alléltömeggel bíró csoportokra osztottuk. A medián értéknél magasabb *CALR* VAF értékek szignifikáns összefüggést mutattak a magasabb szérumszintű LDH értékekkel ET-ben (510 vs. 351 NE/l, *p*=0,01). Bár a szignifikancia szintjét nem érte el ez az összefüggés, a mediánnál magasabb *CALR* VAF értékek esetében magasabb myelofibrotikus rátát figyeltünk meg (19% vs 5%, *p*=0,08), illetve a thrombotikus események gyakoribb megjelenését (14% vs 6%, *p*=0,43). PMF esetében, a *JAK2* mutációhoz hasonlóan, a *CALR* mutáns alléltömeg nem mutatott szignifikáns összefüggést egyetlen klinikai paraméterrel sem. Valamennyi vizsgált paraméter a 9. táblázatban látható összefoglalva.

**9. táblázat:** A *CALR* mutáns alléltömeg összefüggése a legfontosabb laboratóriumi és klinikai paraméterekkel esszenciális thrombocythaemia és primer myelofibrózis esetében

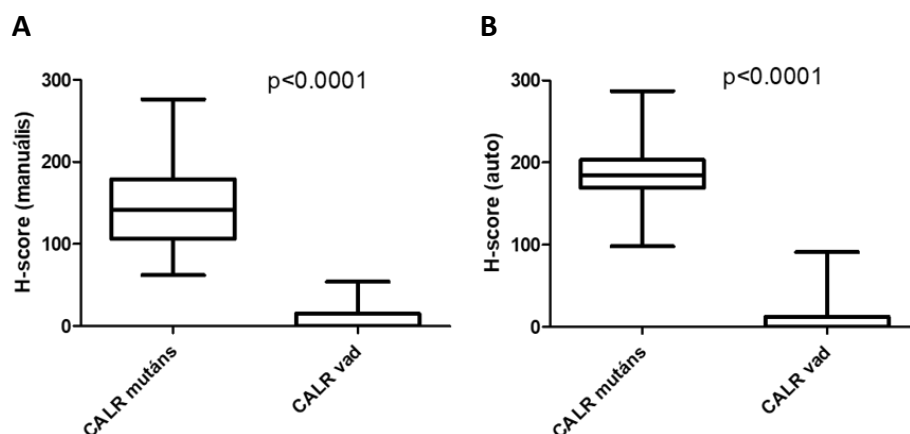
CALR mutáns alléltömeg	ET n=104			PMF n=49		
	< medián	> medián	mediánérték (%)	< medián	> medián	mediánérték (%)
Életkor diagnóziskor, év medián (tartomány)	58 (24-89)	55 (4-82)	42,7	64,5 (37-81)	61 (29-79)	49,6
	$P=0,65$			$P=0,71$		
Hemoglobin, g/dl, medián (tartomány)	13,6 (8,3-15,7)	12,0 (6,1-17,5)	44	11,4 (2,1-15,4)	11,2 (5,6-14,9)	49,9
	$P=0,07$			$P=0,47$		
Fehérvérszám, G/L, medián (tartomány)	8,4 (4,5-19,6)	8,7 (3,8-25)	44	10,9 (3,8-18,9)	9,6 (2,8-20)	49,9
	$P=0,94$			$P=0,89$		
TCT szám, G/L, medián (tartomány)	970,5 (524-2248)	916 (540-2605)	42,7	625 (97-1791)	598 (112-1998)	49,9
	$P=0,83$			$P=0,84$		
Szérum LDH, IU/L, medián (tartomány)	351 (185-632)	510 (137-999)	43,8	576,5 (202-1774)	874,5 (414-1475) 	50,0
	$P=0,01$			$P=0,52$		
Thrombotikus események - diagnózis előtt (esetszám, %)	2/36 (6%)	5/37 (14%)	32,9	Nem történt adatgyűjtés		
	$P=0,43$					
Thrombotikus események - diagnózist követően (esetszám, %)	5/39 (13%)	11/44 (25%)	42,6	1/14 (7%)	4/18 (22%)	49,6
	$P=0,18$			$P=0,36$		
AML-transzformáció (esetszám, %)	1/47 (2%)	2/48 (4%)	43,1	0/22 (0%)	1/22 (5%) 	50,0
	$P=1,00$			$P=1,00$		
MF-transzformáció (esetszám, %)	2/39 (5%)	7/37 (19%)	44	-		
	$P=0,08$					
Cytoreductív terápia (esetszám, %)	30/42 (71%)	35/41 (85%)	44,5	9/13 (69%)	12/14 (85%) 	50,0
	$P=0,18$			$P=0,38$		

Megjegyzés: A medián értékek különbözősége abból adódik, hogy nem minden beteg esetében volt minden paraméter elérhető. (Forrás: Gángó és mtsai., *Leukemia Research* 2018)

### V.4.3 *CALR* mutációk fehérje-szintű mennyiségi meghatározása ET-ben és PMF-ben

#### V.4.3.1 *CALR* mutációs státusz meghatározása *CAL2* IHC eljárás alkalmazásával

A *CALR* mutáció-specifikus *CAL2* antitest alkalmazásával 26, korábban a molekuláris vizsgálat alapján *CALR* vad típusú és 91 *CALR* mutáns (55 ET és 36 PMF) esetben végeztük el a *CALR* mutációk fehérje-szintű mennyiségi analizisét. A *CALR* vad típusú esetek egyetlen esetben sem mutattak specifikus *CAL2* jelölődést, míg a molekuláris vizsgálatnál *CALR* mutáns esetek mindegyike pozitívnak bizonyult az immunhisztokémiai vizsgálatnál is. A *CALR* mutáns és vad típusú esetek a manuális és automatizált analízissel nyert intenzitási pontértékek („score”) alapján is elkülönültek egymástól. A vad típusú betegek esetében a manuális analízissel meghatározott  $H_{\text{man}}$  (lásd IV fejezetben) értékek tekintetében átlagértéke 8,6-nak adódott (tartomány: 0-54), míg az automatizált analízis által meghatározott  $H_{\text{auto}}$  (lásd IV fejezetben) értékek átlaga 10,0 (tartomány: 0-91) volt. A *CALR* mutációt hordozó betegek esetében az intenzitás értékek az alábbiak szerint alakultak:  $H_{\text{man}}$  score: 144,5 (62-276),  $H_{\text{auto}}$  score: 186,5 (98-287). (50. ábra). A kidolgozott IHC algoritmus 58-as  $H_{\text{man}}$  és 95-ös  $H_{\text{auto}}$  vágóérték mellett 100%-os specificitással és szenzitivitással bizonyult alkalmasnak a *CALR* mutációs státusz nagy biztonsággal történő meghatározására.



**50. ábra:** A *CAL2* immunhisztokémiai festés értékelése során létrehozott manuális H pontértékek ( $H_{\text{man}}$ ) és automatizált analízis pontértékeinek ( $H_{\text{auto}}$ ) megoszlása **A:** esszenciális thrombocythaemia (n=55) és **B:** primer myelofibrózis (n=36) esetében. (Forrás: Mózes Réka, doktori értekezés 2019)

A *CALR* mutációk fehérje-szintű mennyiségi analizisét összesen 18 féle *CALR* mutáció esetében végeztük el (10. táblázat), melyek között a kanonikus 1-es és 2-es típusú *CALR* mutációk mellett 16 különböző 1-es típus-szerű, 2-es típus-szerű és számos egyéb ritka mutáció is fellelhető volt. Ez utóbbi 16 különböző típusú *CALR* mutáció esetében elsőként

demonstráltuk a CAL2 IHC analízis alkalmazhatóságát a *CALR* mutációs státusz meghatározásában. Három esetben többszörös *CALR* vagy együttes *CALR* és *JAK2* V617F mutációt figyeltünk meg (10. táblázat).

**10. táblázat:** A fehérje-szintű analízis során vizsgált *CALR* mutációk típusa és megoszlásuk

CALR mutáció	Leírás	Kategória	össz (n)	ET (n)	PMF (n)	CAL2 IHC+
Type 1	c.1092_1143del	Type 1-szerű	47	26	21	<b>47/47</b>
Type 2	c.1154_1155insTTGTC	Type 2-szerű	23	19	4	<b>23/23</b>
Type 7	c.1102_1153del	Type 1-szerű	2	2	0	<b>2/2</b>
Type 8	c.1104_1137del	Type 1-szerű	1	1	0	<b>1/1</b>
Type 24	c.1120_1138del	Egyéb	1	1	0	<b>1/1</b>
Type 33	c.1154_1155insATGTC	Type 2-szerű	1	1	0	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1099_1150del52	Type 1-szerű	2	0	2	<b>2/2</b>
"egyéb"	c.1100_1145del46	Type 1-szerű	1	1	0	<b>1/1</b>
"egyéb"	[c.1102A>G, c.1103_1136del34]	Type 1-szerű	1	1	0	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1103_1136del34	Type 1-szerű	1	1	0	<b>1/1</b>
"egyéb"	[c.1103A>T, c.1104_1137del34]	Type 1-szerű	1	0	1	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1105_1156del52	Type 1-szerű	1	1	0	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1110_1141del32	Type 1-szerű	1	0	1	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1116_1146del31	Type 1-szerű	1	0	1	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1125_1146del22	Egyéb	1	0	1	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1135_1138del4	Egyéb	1	0	1	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1155_1158GGAG>TTGTCAGAA	Type 2-szerű	1	0	1	<b>1/1</b>
"egyéb"	c.1158_1159insAGGACAAGGAG	Type 2-szerű	1	0	1	<b>1/1</b>
<b>Kombinált mutációk</b>						
Type 1 + Type 2	c.1092_1143del + c.1154_1155insTTGTC	n.a.	1	0	1	<b>1/1</b>
Type1 + egyéb	c.1092_1143del + c.1149_1152GGAC>TTGTCA	n.a.	1	0	1	<b>1/1</b>
JAK2 V617F + Type1	c.1092_1143del	n.a.	1	1	0	<b>1/1</b>

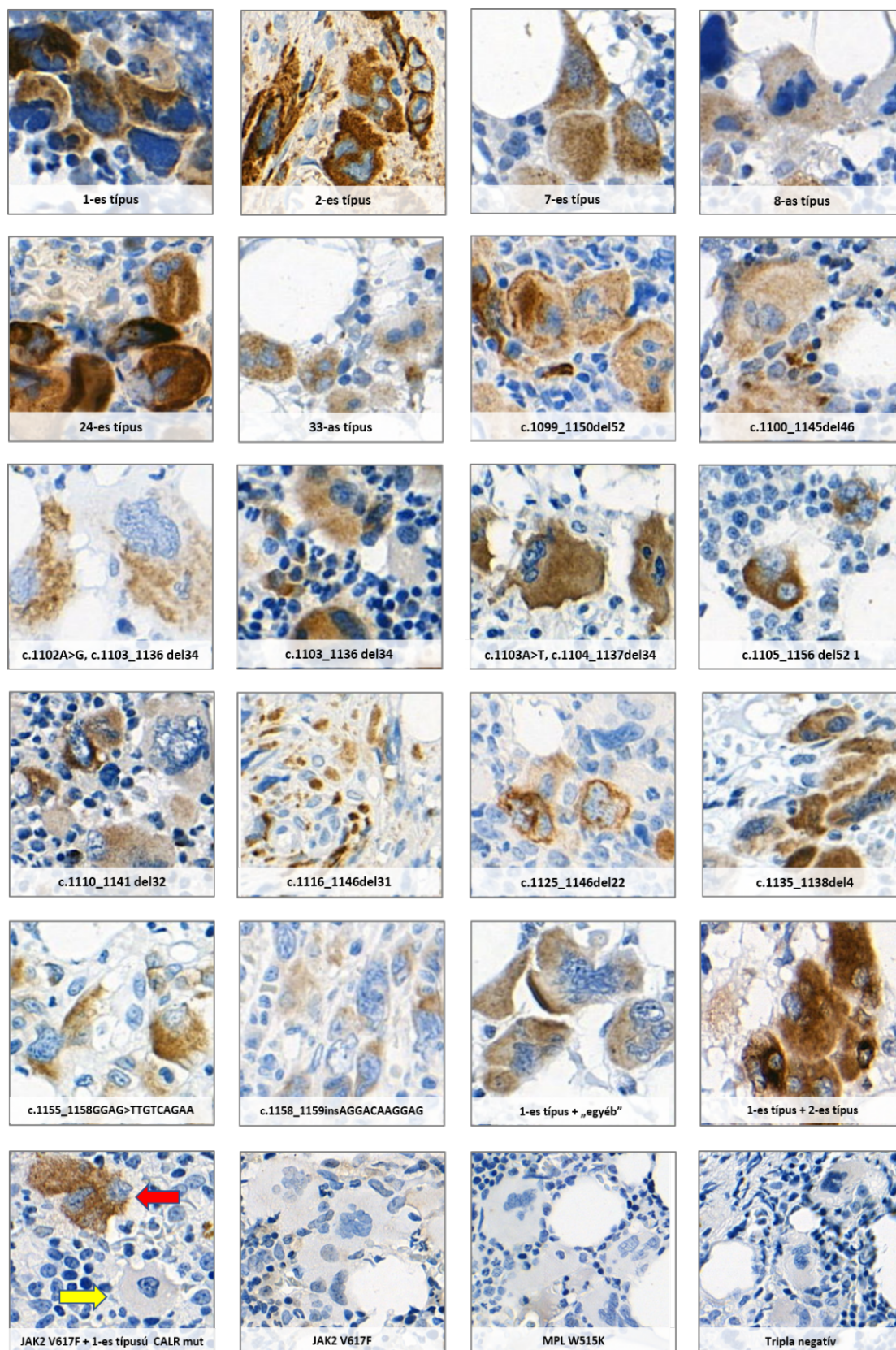
**Negatív kontrollok**

Genotípus	össz(n)	ET (n)	PMF (n)	CAL2 IHC+
Tripla negatív	14	8	6	<b>0/14</b>
JAK2 V617F mut	7	4	3	<b>0/7</b>
MPL W515K/L mut	4	2	2	<b>0/4</b>
MPL W515K/L mut	1	0	1	<b>0/1</b>

*Rövidítések: ET: esszenciális thrombocythaemia, PMF: primer myelofibrózis, IHC: immunhisztokémia, N.A.: nem alkalmazható, Mut: mutáns. (Forrás: Mózes és mtsai., Pathology 2019)*

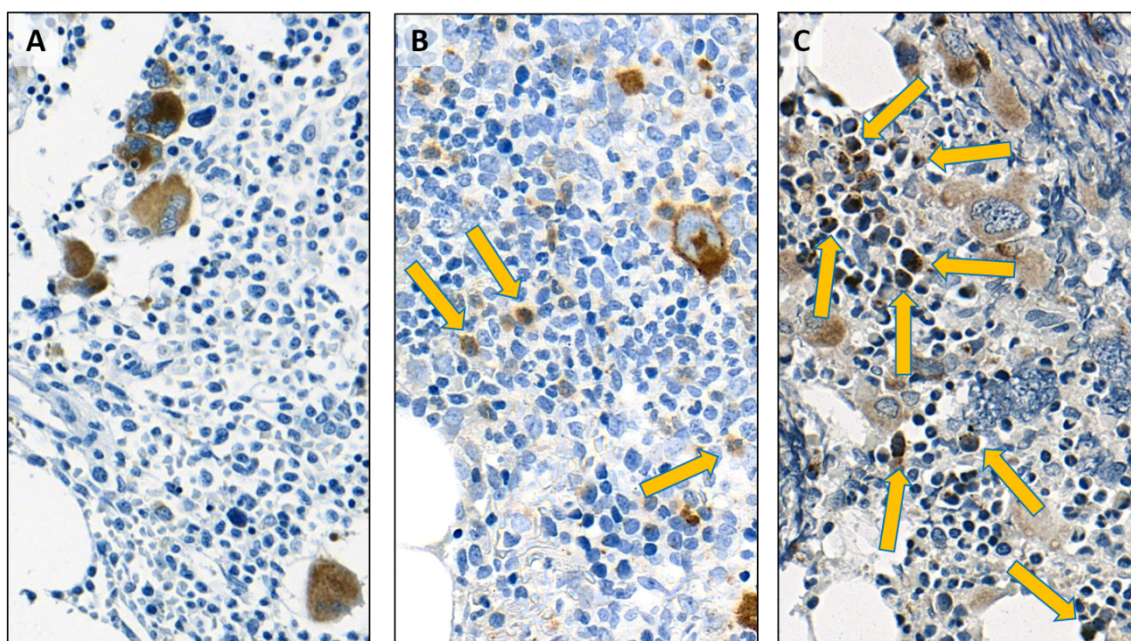
Az ET és PMF esetek között nem figyeltünk meg különbséget a CAL2 jelölődés intenzitásában, valamennyi esetben diffúz citoplazmatikus jelölődést dokumentáltunk. Az 51. ábrán valamennyi általunk vizsgált *CALR* mutációtípus, valamint negatív kontrollok reprezentatív CAL2 IHC felvétele látható. Kiemelendő megfigyelés, hogy a *JAK2* V617F és *CALR* mutációt is hordozó esetben teljesen pozitív és teljesen negatív megakaryocytákat is megfigyeltünk a vizsgálati mintában (51. ábra). A *CALR* mutáns esetek mintegy felében (46%, 42/91) a non-megakaryocyta sejtekben is megfigyeltünk CAL2 jelölődést. A CAL2+ non-megakaryocyta sejteket granulopoetikus prekurzoroknak tekintettük, arányuk 0-65%-os tartományban mozgott (52. ábra).





**51. ábra:** CAL2 monoklonális antitesttel pozitívan festődő, különböző *CALR* mutációkat hordozó sejtek reprezentatív felvételei. A *CALR* negatív kontroll esetek (utolsó sor) nem mutatnak specifikus jelölődést a CAL2 antitesttel. A *CALR* és *JAK2* V617F dupla mutáns esetben a piros nyíl pozitív (*CALR* mutáns) megakaryocytát, míg a sárga nyíl egy negatív (*CALR* vad típusú) megakaryocytát jelöl. (Forrás: Mózes és mtsai., *Pathology* 2019)



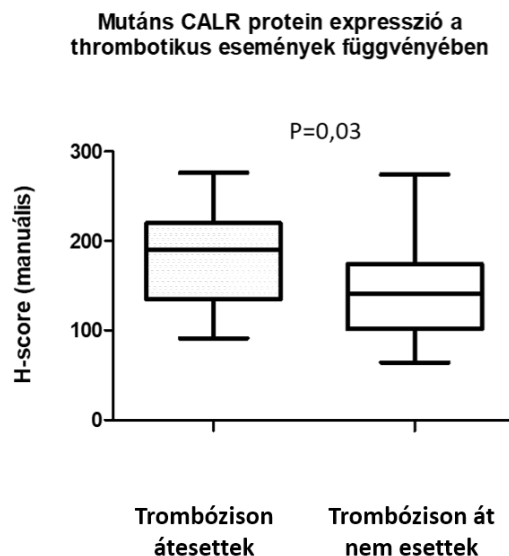


**52. ábra:** A CAL2 pozitívítást mutató non-megakaryocita szemléltetése (sárga nyilakkal jelölve)  
**A:** CAL2 pozitív non-megakaryocita sejtek hiányában, **B:** alacsony számú és gyenge CAL2 jelölődést mutató granulopoetikus prekursor sejtrel; és **C:** nagyszámú, intenzív CAL2 festődést mutató non-megakaryocita sejtek jelenlétében. (Forrás: Mózes és mtsai., Pathology 2019)

#### V.4.3.2 CALR mutáns alléltömeg összefüggése a klinikummal

A CAL2 IHC-val meghatározott mutáns alléltömeg ( $H_{\text{man}}$  és  $H_{\text{auto}}$  score-ok), összefüggéseit vizsgáltuk a betegek különböző klinikai paramétereivel. A fehérje-szintű CALR adatok nem mutattak összefüggést a betegek LDH-szintjével, thrombocyta számával, vörösvértest számával, fehérvérsejt-számával vagy hematokrit-értékeivel. Mindazonáltal a major thrombotikus eseményeken (artériás trombózisok: a. poplitea occlusio, acut myocardialis infarctus, ischaemiás stroke, és vénás trombózisok: pulmonális embólia, v. femoralis trombózis, v. hepatica trombózis, és v. portae trombózis) átesett betegek esetében szignifikánsan magasabb  $H_{\text{man}}$  értékeket ( $p=0,03$ ) dokumentáltunk, szemben az ilyen eseményekre negatív betegekkel (53. ábra).

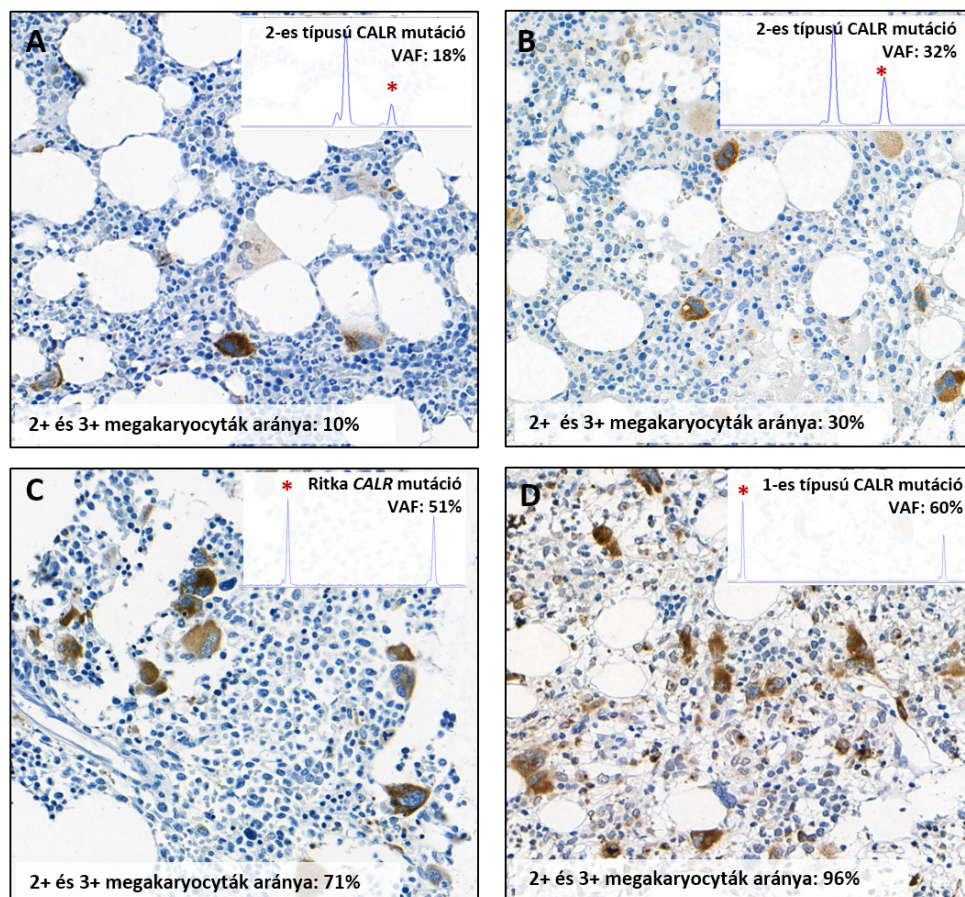




**53. ábra:** A major thrombotikus eseményeken átesett betegekben (n=9), szignifikánsan magasabb  $H_{\text{man}}$  score-t dokumentáltunk a thrombotikus eseményeken át nem esett betegekhez (n=43) képest.

#### V.4.3.3 Fehérje-szintű és molekuláris adatok összefüggése

A fehérje-szintű vizsgálatokba bevont 55 ET és 36 PMF eset DNS szintű *CALR* VAF értékeit fragmensanalízissel határoztuk meg (lásd IV.9 fejezet). Ezen VAF értékek 13% és 94% között mozogtak, 49,9%-os átlagértékkel az ET betegek és 41,1%-os átlagértékkel a PMF betegek csoportjában. A molekuláris vizsgálattal meghatározott VAF értékek nem mutattak szoros összefüggést a CAL2 IHC vizsgálat során meghatározott fehérje-szintű *CALR* mutáns alléltömeggel ( $H_{\text{man}}$  és  $H_{\text{auto}}$  értékek). A közepes (2+) és erős (3+) CAL2 jelölődést mutató sejtek aránya összefüggést mutatott a magasabb *CALR* variáns allélfrekvenciával, az összefüggés ugyanakkor nem bizonyult szignifikánsnak. Az 54. ábra a közepes és erős CAL2 pozitivitást mutató sejtek arányának és a molekuláris vizsgálattal meghatározott *CALR* VAF értékeknek az összefüggését demonstrálja.



**54. ábra:** A molekuláris vizsgálattal mért *CALR* variáns allélfrekvencia és a közepes (2+) valamint erős (3+) CAL2 jelölődést mutató megakaryocyták arányának összefüggése A-D: reprezentatív eseteket bemutatásával. (A piros csillagok az a mutáns *CALR* allélt jelölik az elektroferogramokon.) (Forrás: Mózes és mtsai., *Pathology* 2019)

#### Ph<sup>+</sup> myeloproliferatív neopláziák kapcsán tett kiemelt megfigyeléseink:

- Nagyszámú beteganyag felhasználásával új összefüggéseket azonosítottunk a *JAK2* és *CALR* mutáns allélterhelés és a betegek klinikai paraméterei között.
- Új, korábban nem azonosított *CALR* mutációkat fedeztünk fel.
- A legtöbb eddig azonosított *CALR* mutáció esetében működőképes, a mutációk automatizált, fehérje-szintű mennyiségi meghatározására alkalmas módszert dolgoztunk ki.

## V.5 Csírvonalbeli genetikai eltérések azonosítása familiáris myeloid onkohematológiai kórképekben

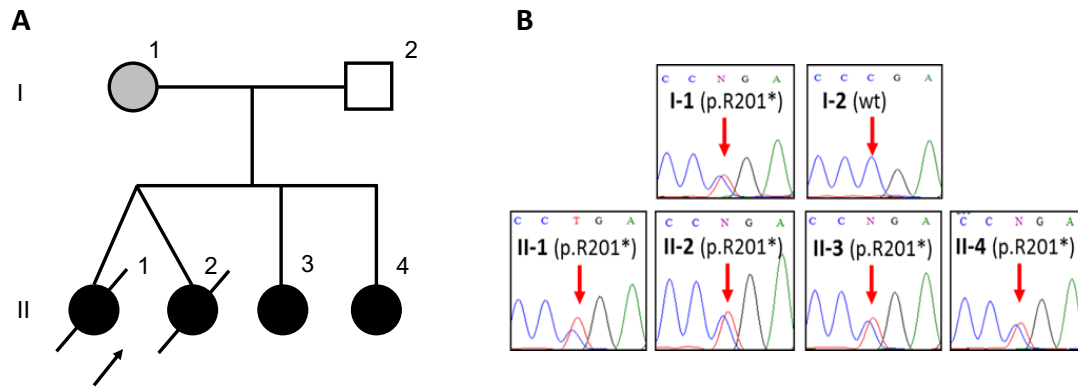
A familiáris myeloid kórképeket érintő vizsgálataink során öröklődő genetikai eltéréseket kerestünk a dokumentált családi halmozódás hátterében, valamint a csírvonalbeli hajlamosító genetikai eltérésekkel kooperáló további genomi változásokat térképeztük fel [209, 210]. Munkánk során azonosítottuk és genetikailag is jellemeztük az első hazai familiáris myeloid kórképekben szenvedő családokat [211, 212].

### V.5.1 JAK-STAT útvonal kooperáló mutációinak azonosítása *RUNX1* mutáns FPD-AML-ben teljes exomszekvenálással

Egy hazai, malignus myeloid kórképek halmozódását mutató család vizsgálata során azonosítottuk az eddigi ismert legtöbb elsőfokú rokont tartalmazó FPD-AML családot, valamint a család részletes vizsgálata során a JAK-STAT útvonal komponenseinek kooperáló genetikai eltéréseit fedeztük fel a klinikai heterogenitás hátterében.

A vizsgált család esetében összesen négy testvér esetében jelent meg MDS vagy AML (55.A ábra). A gyermekek közül a dizigóta ikerpár (II.1 és II.2) betegsége 2002-ben szinte egyidőben, a gyermekek 5 éves korában került felismerésre. Mindkét gyermek esetében MDS talaján kialakuló heveny lefolyású szekunder AML manifesztálódott, amely egy éven belül mindkét gyermek halálához vezetett. A család születése óta thrombocytopenia miatt követett legfiatalabb gyermekénél (II.4) tíz évvel később (2012-ben) M4 altípusú AML-t diagnosztizáltak a gyermek 5 éves életkorában. A család történetének e fázisában nyílt először lehetőségünk genetikai vizsgálatokat végezni. A HSCT donorforrásaként felmerülő testvér (II.3) esetében ekkor elvégzett csontvelő vizsgálat enyhe diszplasztikus jeleket mutatott, így ideges donoros transzplantációt végeztek a II.4 gyermek esetében. A sikeres transzplantációt követően két évvel a betegség relabált, amit egy második, idegendonoros transzplantáció követett. A beteg a mai napig teljes csontvelői donor kimérizmus mellett komplett remisszióban van. A II.3 testvér jelen pillanatban „figyelő várakozás” stratégia mellett klinikailag tünetmentes. Az édesanya (I.1) 40 éves korában klinikailag tünet- és panaszmentes.

A család genetikai vizsgálata során mind a négy gyermek és édesanyjuk (I.1) esetében is kimutattuk a *RUNX1* gén p.R201\* stop kodont eredményező mutációját heterozigóta formában, ezáltal az eddig közölt legtöbb elsőfokú rokont tartalmazó *RUNX1* mutáns FPD-AML családot fedeztük fel (55.B ábra).



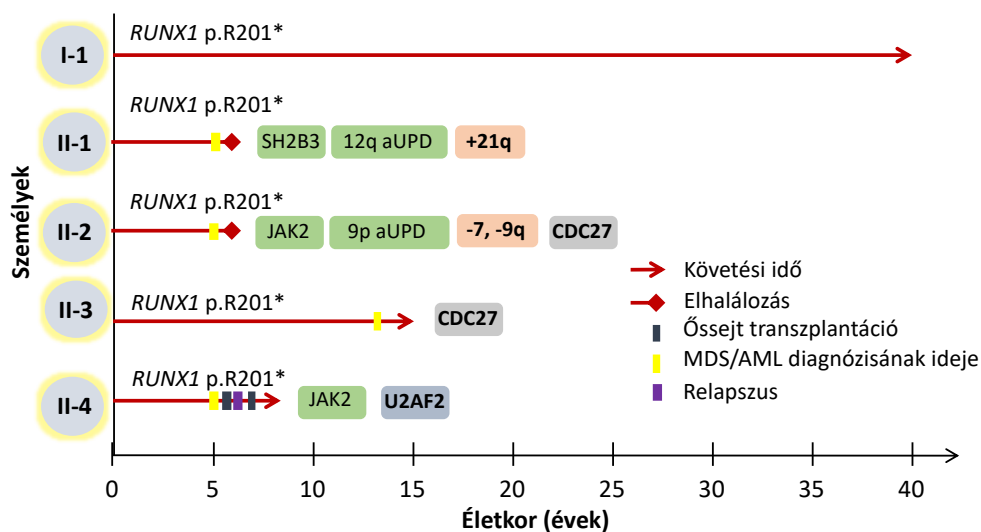
**55. ábra:** A germline *RUNX1* pontmutációt hordozó család családfája. **A:** A fekete körök azokat a személyeket (II.1, II.2, II.3 és II.4) jelölik, akiknél manifesztálódott az MDS/AML. A szürke kör a germline *RUNX1* variánsra nézve tünetmentes hordozót (I.1) jelöli. **B:** Az elektroferogramok az azonosított *RUNX1* p.R201\* stop kodont eredményező mutációt ábrázolják. Az édesanya (I.1) tünetmentes hordozó, az édesapa (I.2) nem hordozza a *RUNX1* p.201\* mutációt.

A család esetében megfigyelt nagyfokú klinikai heterogenitás háttérében álló másodlagos genetikai eltérések azonosításának céljából a család valamennyi tagjában elvégzett WES segítségével a JAK-STAT útvonal kooperáló mutációt fedeztük fel. A WES-sel azonosított variánsok listája a [11. táblázatban](#) található. A gyermekekben azonosított eltéréseket a szülők exom szekvenciájához hasonlítottuk, kizárva ezáltal az öröklődő polimorfizmusokat az analízisből.

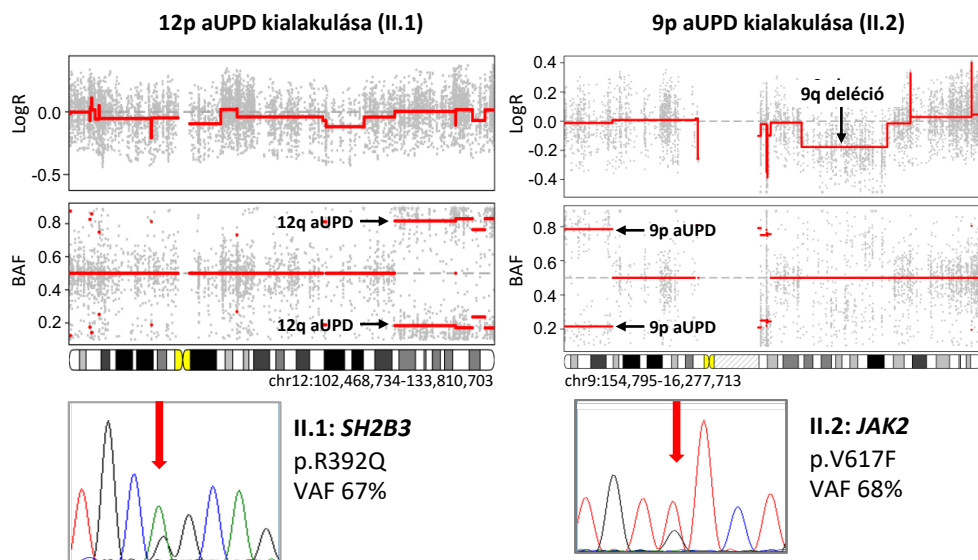
A heveny betegségfolyást mutató gyermekek (II.1, II.2 és II.4) esetében a JAK-STAT jelátviteli út komponenseinek mutációit azonosítottuk. Az ikerpár egyik tagjában (II.2) és a II.4 gyermek esetében a *JAK2* gén V617F mutációt mutattuk ki, míg a II.1 gyermek esetében a JAK-STAT jelátvitel negatív szabályozója, az *SH2B3* (vagy *LNK*) R392Q funkcióvesztéses mutációját detektáltuk ([56. ábra](#)). További kooperáló mutációkat azonosítottunk a sejtciklus szabályozásában résztvevő *CDC27* génben (*CDC27* I634T mutáció II.2 és II.3 gyermek esetében), valamint a splicingban szerepet betöltő *U2AF2* gén Q147E mutációját derítettük fel a II.4 gyermekben.

A WES adatokból elvégzett kópiaszámeltérés-analízis során a *JAK2* V617F mutációt hordozó II.2 gyermek esetében a 9-es kromoszóma rövid karján (9p) a *JAK2* lókuszt mitotikus rekombinációja kapcsán kialakult szerzett uniparentális diszómia (aUPD) a *JAK2* V617F mutáció homozigótává válásához vezetett, amit a mutáció magas VAF értéke is alátámaszt ([57. ábra](#)). Rendkívül érdekes módon az ikerpár másik tagjában, ugyancsak aUPD következtében homozigótaság alakult ki a kooperáló *SH2B3* R392Q mutáció esetében is a 12q

kromoszómakaron (57. ábra). A kópiaszám analízis továbbá a II.1 beteg esetében 21q nyerést, míg a II.2 beteg esetében a 7-es kromoszóma monoszómiáját, valamint 9q deléciót azonosított.



**56. ábra:** A germline *RUNX1* mutációt hordozó FPD-AML modell családban azonosított másodlagos kooperáló genetikai eltérések és a fő klinikai események megjelenítése.



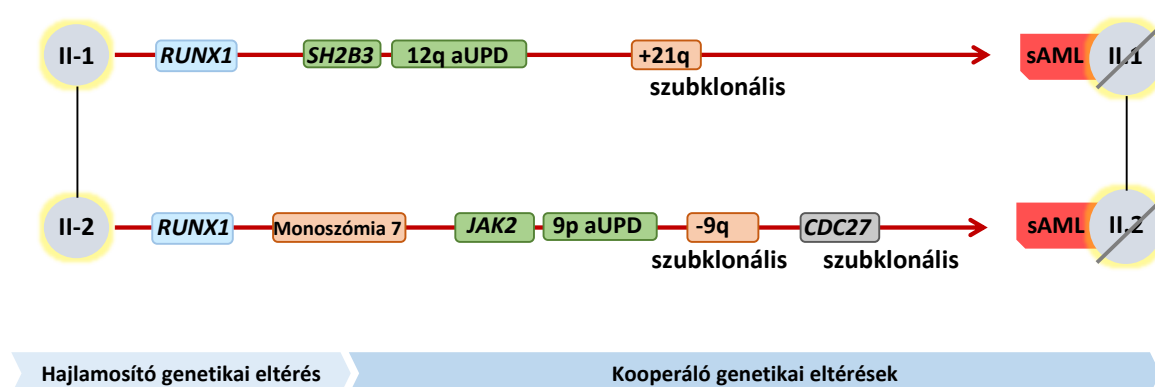
**57. ábra:** A *JAK2* és *SH2B3* géneket érintő szerzett uniparentális diszómia (aUPD) kialakulásának szemléltetése az exomszekvenálással nyert B-allél frekvenciák (BAF) alapján. Az aUPD a *JAK2* V617F és *SH2B3* R392Q mutációk homozigótává válását eredményezte a *chr12:102,468,734-133,810,703* és a *chr9:154,795-16,277,713* kromoszóma régiókban. A II.2 betegben a 9q kromoszóma régiót érintő deléciót is azonosítottunk, amely a LogR hányados csökkenéséhez vezetett.



**11. táblázat:** A teljes exomszekvenálással azonosított variánsok listája a *RUNX1* mutációt hordozó család négy tagjában

Beteg	Ensembl gén azonosító	Ensembl transzkriptum azonosító	Gén	Kromoszóma	Genomikus pozíció	Nukleotid csere (ref/variant)	cDNS pozíció	aminosav pozíció	aminosav csere	Mutáció típusa	VAF
II.1	ENSG00000111252	ENST00000341259	<i>SH2B3</i>	chr12	111885287	G/A	1532	392	R>Q	missense- non-syn	0,672
II.1	ENSG00000182704	ENST00000333090	<i>TSKU</i>	chr11	76507435	C/G	949	259	L>V	missense- non-syn	0,523
II.1	ENSG00000198911	ENST00000361204	<i>SREBF2</i>	chr22	42300883	C/A	3276	1037	A>D	missense- non-syn	0,422
II.1	ENSG00000179044	ENST00000314586	<i>EXOC3L1</i>	chr16	67218676	A/G	2184	648	L>P	missense- non-syn	0,389
II.1	ENSG00000168959	ENST00000305432	<i>GRM5</i>	chr11	88337977	G/A	1453	435	R>W	missense- non-syn	0,364
II.1	ENSG00000006283	ENST00000359106	<i>CACNA1G</i>	chr17	48697116	G/A	5854	1952	E>K	missense- non-syn	0,354
II.1	ENSG00000241935	ENST00000370646	<i>HOGA1</i>	chr10	99371366	G/A	1295	312	A>T	missense- non-syn	0,352
II.1	ENSG00000177689	ENST00000356790	<i>MAGEB10</i>	chrX	27839737	G/T	559	105	S>I	missense- non-syn	0,331
II.1	ENSG00000134222	ENST00000369903	<i>PSRC1</i>	chr1	109824633	G/C	267	43	R>G	missense- non-syn	0,200
II.1	ENSG00000111642	ENST00000309577	<i>CHD4</i>	chr12	6697051	C/T	3694	1177	R>H	missense- non-syn	0,056
II.2	ENSG00000096968	ENST00000381652	<i>JAK2</i>	chr9	5073770	G/T	2343	617	V>F	missense- non-syn	0,682
II.2	ENSG0000015475	ENST00000342111	<i>BID</i>	chr22	18222879	AC/A	377	96	S>V S	frameshift	0,375
II.2	ENSG00000007171	ENST00000313735	<i>NOS2</i>	chr17	26093566	G/T	2450	739	S>Y	missense- non-syn	0,336
II.2	ENSG00000143889	ENST00000410076	<i>HNRPLL</i>	chr2	38809018	C/A	886	275	C>F	missense- non-syn	0,333
II.2	ENSG00000101773	ENST00000327155	<i>RBBP8</i>	chr18	20572749	A/G	1295	320	E>G	missense- non-syn	0,323
II.2	ENSG00000151012	ENST00000280612	<i>SLC7A11</i>	chr4	139104402	G/A	1253	325	L>F	missense- non-syn	0,288
II.2	ENSG00000005884	ENST00000320031	<i>ITGA3</i>	chr17	48165611	G/A	3398	1023	R>H	missense- non-syn	0,244
II.2	ENSG00000004897	ENST00000531206	<i>CDC27</i>	chr17	45214548	A/G	1905	634	I>T	missense- non-syn	0,167
II.2	ENSG00000197689	ENST00000329040	<i>TBC1D29</i>	chr17	28890301	G/A	460	104	S>N	missense- non-syn	0,093
II.2	ENSG00000103365	ENST00000309859	<i>GGA2</i>	chr16	23481460	C/A	1560	493	D>Y	missense- non-syn	0,081
II.3	ENSG00000132196	ENST00000254521	<i>HSD17B7</i>	chr1	162762514	C/T	156	34	A>V	missense- non-syn	0,495
II.3	ENSG00000253873	ENST00000398587	<i>PCDHGA11</i>	chr5	140801000	C/T	239	69	S>F	missense- non-syn	0,477
II.3	ENSG00000222036	ENST00000409832	<i>POTEG</i>	chr14	19574214	G/C	1323	424	S>T	missense- non-syn	0,200
II.3	ENSG00000244482	ENST00000245621	<i>LILRA6</i>	chr19	54745550	G/T	697	187	T>N	missense- non-syn	0,103
II.3	ENSG00000004897	ENST00000531206	<i>CDC27</i>	chr17	45219311	T/C	1481	493	I>V	missense- non-syn	0,075
II.3	ENSG00000072736	ENST00000329524	<i>NFATC3</i>	chr16	68156512	C/A	750	242	C>*	nonsense	0,049
II.3	ENSG00000079432	ENST00000160740	<i>CIC</i>	chr19	42796978	C/A	3476	1146	P>T	missense- non-syn	0,048
II.3	ENSG00000124103	ENST00000371328	<i>C20orf106</i>	chr20	55100084	C/A	543	74	Q>K	missense- non-syn	0,045
II.3	ENSG00000138823	ENST00000511045	<i>MTTP</i>	chr4	100532602	G/A	2075	688	G>S	missense- non-syn	0,042
II.4	ENSG00000169783	ENST00000355300	<i>LINGO1</i>	chr15	77906780	T/C	1521	490	Q>R	missense- non-syn	0,535
II.4	ENSG00000063244	ENST00000308924	<i>U2AF2</i>	chr19	56172508	C/G	1494	147	Q>E	missense- non-syn	0,412
II.4	ENSG00000236669	ENST00000444154	<i>AC006372.1</i>	chr7	157318686	G/A	210	47	R>H	missense- non-syn	0,358
II.4	ENSG00000105655	ENST00000338128	<i>ISYNA1</i>	chr19	18547585	C/T	736	173	R>Q	missense- non-syn	0,349
II.4	ENSG00000130758	ENST00000253055	<i>MAP3K10</i>	chr19	40710439	G/A	1199	304	R>H	missense- non-syn	0,286
II.4	ENSG00000173040	ENST00000344408	<i>EVC2</i>	chr4	5682988	G/A	923	290	T>M	missense- non-syn	0,241
II.4	ENSG00000101343	ENST00000377340	<i>CRNKL1</i>	chr20	20024164	C/T	1459	476	R>Q	missense- non-syn	0,210
II.4	ENSG00000096968	ENST00000381652	<i>JAK2</i>	chr9	5073770	G/T	2343	617	V>F	missense- non-syn	0,200
II.4	ENSG00000028203	ENST00000397796	<i>VEZT</i>	chr12	95668655	C/T	986	329	P>L	missense- non-syn	0,193
II.4	ENSG00000011454	ENST00000373647	<i>RABGAP1</i>	chr9	125772742	G/C	1618	495	R>P	missense- non-syn	0,136
II.4	ENSG00000124103	ENST00000371328	<i>C20orf106</i>	chr20	55100084	C/A	543	74	Q>K	missense- non-syn	0,102

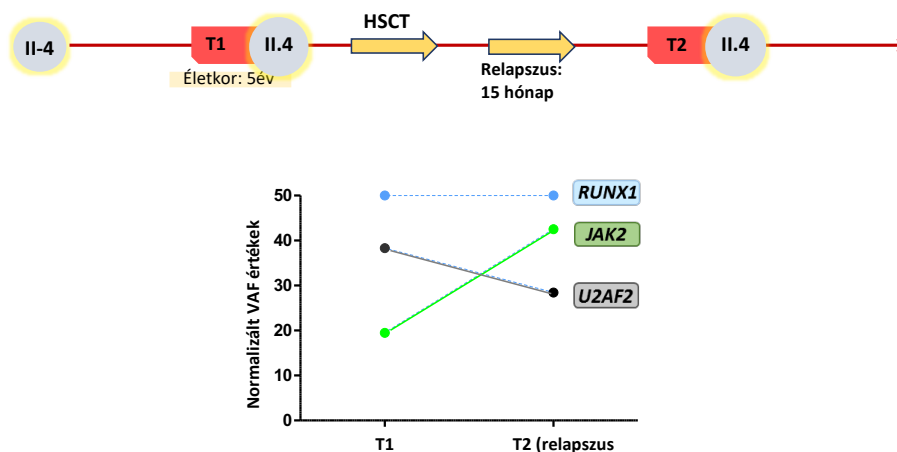
Az egyes mutációkhoz tartozó VAF adatok, valamint a tumorsejt frakciók (CCF: „cancer cell fraction”) alapján lehetőségünk nyílt a II.1 és II.2 betegek esetében a genetikai eltérések kronológiájának meghatározására. Az ikerpár első tagjának (II.1) esetében az első szerzett kooperáló genetikai eltérésnek az *SH2B3* mutáció adódott, amit ezen mutáció homozigótává válása követett aUPD miatt, majd végül a 21q régió amplifikációja jelent meg szubklonális eltérésként. A II.2 gyermek esetében a *JAK2* mutáció kialakulását és annak homozigótává válását megelőzte a 7-es kromoszóma monoszómiája, majd szubklonális eltérésként 9q deléción és *CDC27* mutáció jelent meg (58. ábra).



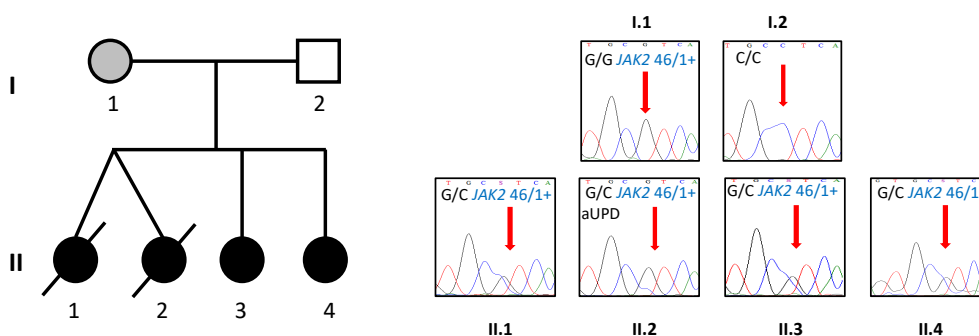
**58. ábra:** A II.1 és II.2 gyermekek (ikerpár) esetében megjelenő genetikai eltérések kronológiája az exomszekvenálási adatok variáns allélfrekvenciája valamint a tumorsejt frakciók alapján. Rövidítés: sAML: szekunder AML.

A II.4 gyermek esetében az első transzplantációt követő relapszuskori mintában exomszekvenálást végeztünk, ami arra utalt, hogy a korábban domináns *U2AF2* mutáció mennyisége csökkent, és a betegség ismételt megjelenését feltehetően a *JAK2* V617F mutációt hordozó klón expansziója triggerelte (59. ábra).

A JAK-STAT útvonal komponensek (*JAK2* és *SH2B3*) szerzett mutációinak akvirálására hajlamosító öröklődő genotípus vizsgálata során a *JAK2*+ MPN-ák kialakulására prediszponáló *JAK2* 46/1 haplotípust vizsgáltuk. A haplotípussal szoros kapcsoltságot mutató rs12340895 marker polimorfizmus szekvenálása során valamennyi gyermek esetében heterozigóta 46/1 allélt (GC) detektáltunk (60. ábra). Érdekes módon a II.2 gyermek esetében a 9p régióban kimutatott aUPD a *JAK2* V617F mutáció és az rs12340895 amplifikációjához vezetett, ami arra utal, hogy a *JAK2* V617F mutáció a 46/1 allélon (G) alakult ki. Az édesanya (I.1) homozigótának bizonyult (GG) a *JAK2* 46/1 allélra, míg az édesapa homozigóta non-46/1 allélt (CC) hordozott (60. ábra).



**59. ábra:** A II.4 egyén transzplantáció előtti (T1) és azt követő relapszuskori minták (T2) exomszekvenálása a JAK2 V617F mutáns klón expansziójának szerepére utal a betegség relapszusa során. Rövidítések: HSCT: hemopoetikus őssejttranszplantáció.



**60. ábra:** A JAK2 46/1 haplotípus azonosítása az édesanya és a gyermekek mintáiban. A 46/1 haplotípussal kapcsoltan öröklődő rs12340895 marker polimorfizmust az édesanya (I.1) homozigóta (GG) formában, a gyermekek közül valamennyien heterozigóta (CG) formában hordozták. A II.2 gyermek esetében a 9p kromoszómarégiót érintő uniparentális diszómia miatt bekövetkezett non-46/1 allél elvesztése is látható az elektroferogramon. Az édesapa (I.2) homozigóta (CC) non-46/1 allélt hordozott.



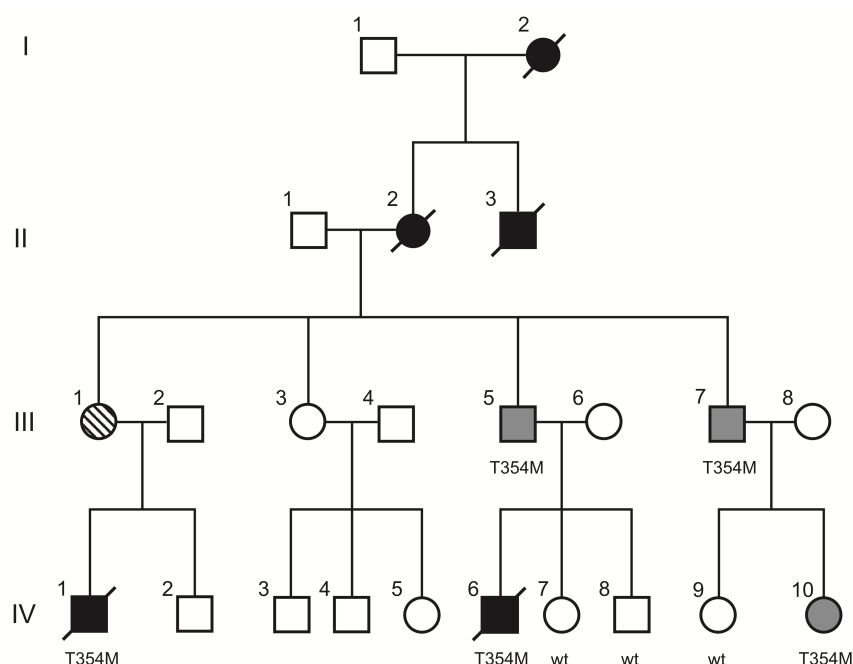
### V.5.2 *ASXL1* kooperáló mutációk azonosítása *GATA2* mutáns familiáris MDS-ben

A germline *GATA2* mutációk felfedezését követően röviddel vizsgáltunk egy familiáris myeloid kórképek (MDS és AML) több generáción keresztüli halmozódását mutató családot, amelyben a proband (IV.6) 23 éves korában jelentkezett cytopeniás panaszokkal, megelőző hematológiai tünetek nélkül. A csontvelői biopszia MDS diagnózisát erősítette meg a 7-es kromoszóma monoszómiájának kíséretében. Az intenzív kemoterápiás kezelést követő első remisszióban a beteg haploidentikus HSCT-ben részesült az édesanyjától (III.6), azonban akut graft vs. host betegségben (GHVD) a transzplantációt követő negyedik hónapban elhunyt. Elsőfokú unokatestvére (IV.1) 18 éves korában megelőző rekurrens fertőzések anamnézisével, a IV.6 beteggel szinte egyidőben, diagnosztizálták az MDS-t, ugyancsak 7-es monoszómia kíséretében. Az idegdonoros HSCT-t követően két évvel, a betegség relapszusának következtében a beteg elhunyt. Harmadik unokatestvérük (IV.10) 31 éves korában minor rekurrens infekciók anamnézisével, monocytopeniával és neutropeniával került kivizsgálásra. A csontvelői vizsgálat normocelluláris mintázatot mutatott dysplasia jelei nélkül, a karyotipizálás sem azonosított kromoszóma-eltérést (61. ábra).

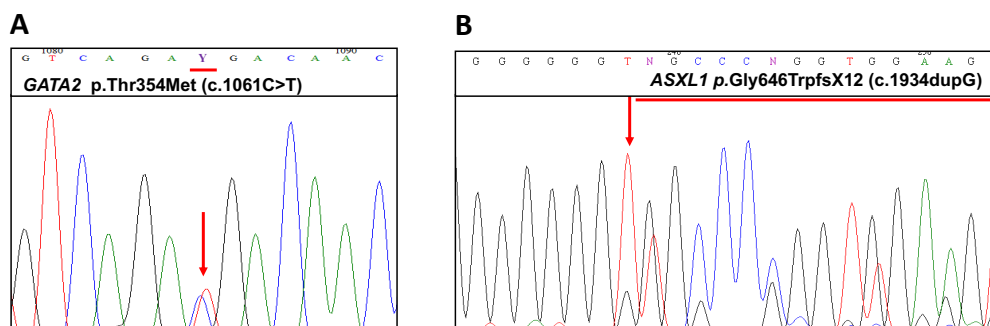
A családban három generációban dokumentáltak malignus myeloid megbetegedést (AML I.1, II.2 és II.3 egyének esetében). A család nyolc tagjában nyílt lehetőségünk genetikai vizsgálatot végezni, amely során a *GATA2* T354M (c.1061C>T) germline mutációját azonosítottuk az érintett IV.1, IV.6 és IV.10 egyénekben, míg a IV.7, IV.8 és IV.9 egyének vad típusú gént hordoztak. A harmadik generációban tünetmentes hordozónak bizonyultak a III. 5 és III.7 egyének. Bár nem állt rendelkezésünkre vizsgálati minta, a III.1 egyén bizonyosan obligát hordozó (61. ábra). A III.1, III.5, III.7, IV.7, IV.8 és IV.9 egyének esetében a hajlamosító csíravonalbeli *GATA2* mutáció ellenére nem alakult ki hematológiai malignitás.

A megfigyelt inkomplett penetrancia hátterében álló kooperáló genetikai mechanizmusok keresése során az agresszív kórlefolyást mutató és a betegség következtében elhunyt IV.1 és IV.6 unokatestvérek esetében a *RUNX1*, *CEBPA*, *NPM1*, *FLT3*, *ASXL1*, *TET2* és *CBL* gének vizsgálata során meglepő módon azonos szomatikus mutációt azonosítottunk az *ASXL1* génben (*ASXL1* Gly646TrpfsX12 frameshift mutáció) (62. ábra). Az *ASXL1* mutáció kizárólag ezen betegekben jelent meg, valamennyi további *GATA2* mutációt hordozó egyén vad típusú *ASXL1* gént hordozott. Az *ASXL1* p.Gly646TrpfsX12 frameshift mutáció jelenléte a 7-es monoszómiával kombinációban az MDS/AML gyors progressziójához és rövid túléléshez vezetett.

Tanulmányunkban elsőként fedeztük fel a 7-es kromoszóma monoszómiájával kísért MDS-ben a *GATA2* és szomatikus *ASXL1* mutációk társulását.



**61. ábra:** A germline *GATA2*-mutációt hordozó család családfája. A négyzetek a férfiakat, a körök a nőket jelölik. A fekete négyzetek és körök azokat a személyeket jelölik (I.2, II.2, II.3, IV.1 és IV.6), akik esetében manifesztálódott az MDS/AML. Az MDS/AML-ben szenvedő családtagok közül a IV.1 és IV.6 személyek mintáiban a *GATA2* transzkripciós faktor génjét érintő missense mutációt (p.Thr354Met) azonosítottunk, azonban a többi érintett családtag esetében nem állt rendelkezésünkre DNS. A szürke négyzetek és a kör (III.5, III.7 és IV.10) azokat a családtagokat jelölik, akik szintén hordozták a kérdéses mutációt, de esetükben nem jelentkezett myeloid malignitás. A rácsozott kör (III.1) a *GATA2* p.Thr354Met eltérésre nézve obligát hordozót jelöl, esetében a DNS-minta hiányában nem tudtuk igazolni a patogén *GATA2* mutáció jelenlétét. A IV.7, IV.8 és IV.9 személyek a *GATA2* génre nézve vad genotípusúak, mintáikban nem volt azonosítható a kérdéses mutáció. A többi családtag vizsgálatát a DNS-minták hiányában nem tudtuk elvégezni. Rövidítések: wt: vad genotípus („wild type”).



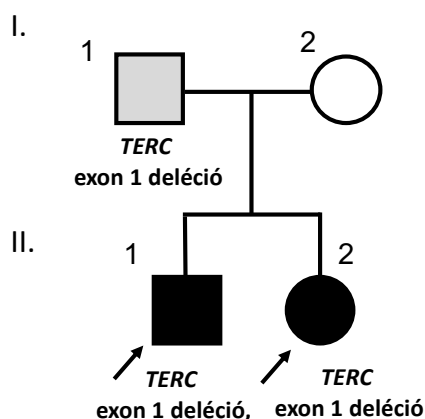
**62. ábra:** A: A heterozigóta germline *GATA2* p.T354M (c.1061C>T) mutáció és B: a szomatikus *ASXL1* p.Gly646TrpfsX12 frameshift mutáció szemléltetése.

### V.5.3 További hazai familiáris MDS/AML családok azonosítása

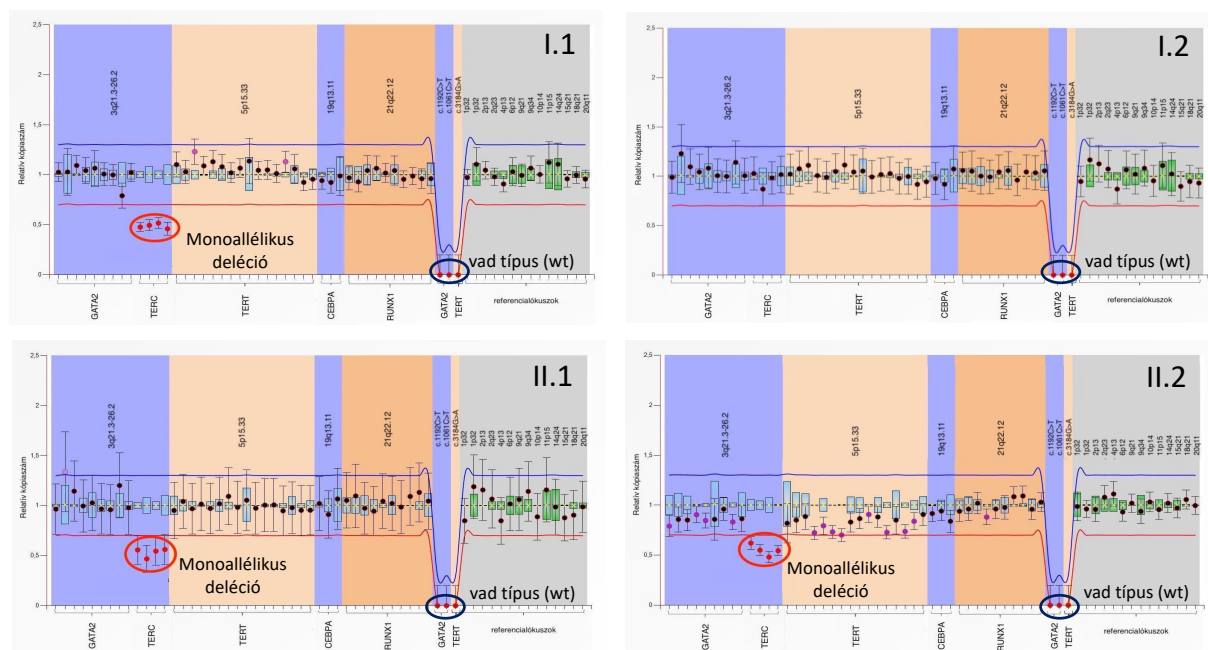
A familiáris myeloid malignitások halmozódását mutató családok vizsgálata során további három családot azonosítottunk, amelyek esetében a *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *TERC/TERC* és *SRP72* gének szekvencia-analízis nem vezetett hajlamosító csíravonalbeli eltérés azonosításához. Ezen családok esetében MLPA segítségével vizsgáltuk 42 célrégió kópiaszám-eltéréseit (lásd IV.11 fejezet, 5. táblázat), és egy esetben sikerült feltárni a családi halmozódás hátterében álló öröklődő genetikai eltérést.

#### V.5.3.1 *TERC* deléció azonosítása familiáris MDS/AML hátterében

A kópiaszám-eltérések analízise során az egyik család esetében, ahol két testvérben (II.1 és II.2) 10 és 14 éves korban alakult ki hypocelluláris familiáris MDS, sikeresen azonosítottuk MLPA segítségével a *TERC* gén 1-es exonjának delécióját a 3-as kromoszóma q karján. A gyermekek 40 éves korában tünetmentes édesapja (I.1) hordozta ugyanezt az eltérést, míg édesanyjuk (I.2) vad típusú *TERC* gént hordozott (63. és 64. ábrák). Az édesapa családi anamnézisében nem találtunk daganatos megbetegedést a felmenők körében.



**63. ábra:** A *TERC* 1-es exon deléciót hordozó család családfája. A négyzetek a férfiakat, a körök a nőket, a fekete nyilak az index eseteket jelölik. Az apa (I.1) és a gyermekek (II.1 és II.2) esetében a *TERC* gén monoallélikus delécióját mutattuk ki. Az édesapa tünetmentes hordozónak bizonyult, a két gyermek esetében hypocelluláris MDS alakult ki. Az édesanya (I.2) esetében vad típusú *TERC* gént detektáltunk.



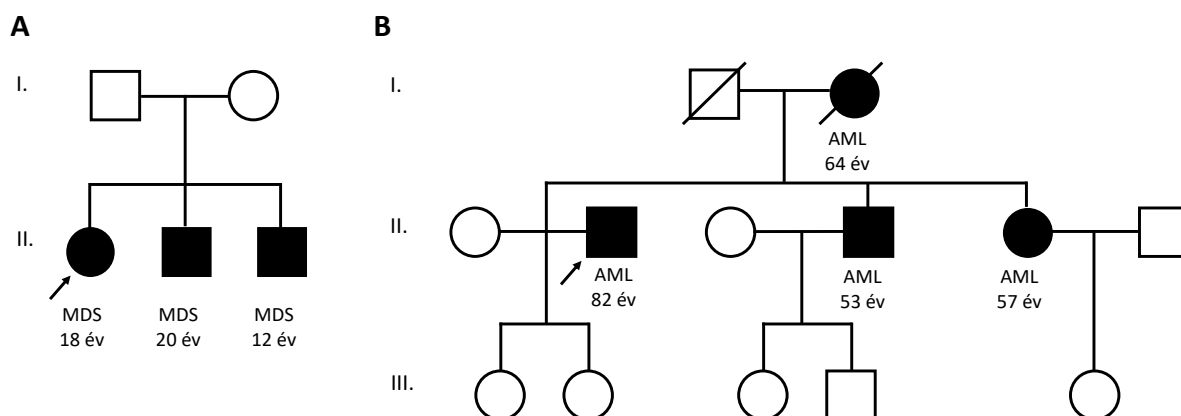
**64. ábra:** P437-B1 szondakeverékkel kimutatott DNS kópiaszám-eltérések ábrázolása a *TERC* deléciót hordozó családnál, az MLPA szondáknak (vízszintes tengely) a relatív kópiaszám (függőleges tengely) függvényében való ábrázolásával. A piros vonal alatti kópiaszám értékek deléciót, míg a kék vonal feletti kópiaszám értékek amplifikációt jeleznek. A *GATA2* c.1192C>T és c.1061C>T, valamint a *TERT* c.3184G<A mutációk vizsgálatára alkalmas szondák esetében detektált kópiaszám érték (0) vad genotípusra utal az adott pontmutációk esetében. Az édesanya (I.2) esetében nem látható kópiaszámeltérés, az édesapa (I.1) és a két testvér (II.1 és II.2) esetében azonosítható volt ugyanaz a *TERC* gén 1-es exonját érintő monoallélikus deléció, amit alátámasztott a régiót lefedő négy szonda mindegyikének relatív kópiaszáma (piros jelzés a profilokon). A betegek sorrendje a fentebb bemutatott családfán prezentált sorrenddel megegyező.

Az azonosított *TERC* eltérés alapján a fentebb bemutatott család a TBD prediszpozíciós szindrómát hordozók közé tartozik. Hazánkban elsőként számoltunk be TBD prediszpozíció talaján kialakult familiáris myeloid megbetegedésről, melynek hátterében germline *TERC* kópiaszám-eltérést azonosítottunk [213].

### V.5.3.2 Familiáris MDS/AML családok ismeretlen genetikai háttérrel

A myeloid malignitások halmozódását mutató hazai családok vizsgálata során azonosított két utolsó család esetében *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *DDX41*, *TERC/TERT* és *SRP72* gének mutáció-analízise és a 48 célrégió kópiaszám-eltéréseinek vizsgálatára alkalmas MLPA vizsgálat segítségével sem azonosítottunk hajlamosító germline genetikai eltérést.

Az egyik családban három gyermek esetében alakult ki hypocelluláris MDS (12, 18 és 20 éves életkorban), a szülők esetében nem volt megfigyelhető hematológiai vagy egyéb malignus megbetegedés (65.A ábra). A másik ismeretlen genetikai háttérű család esetében AML családi halmozódását figyeltük meg négy egyén esetében, későbbi életkorban (53-82 év) (65.B ábra). Ezen családoknál feltehetően genom-szintű mutáció- és kópiaszám-analízis szükséges a családi halmozódás hátterében álló hajlamosító variáns azonosításához.



**65. ábra:** Két hazai, myeloid malignitás halmozódását mutató család családfája, amelyekben a *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *DDX41*, *TERC/TERT* és *SRP72* gének egyikében sem azonosítottunk eltérést, és az alkalmazott MLPA vizsgálat sem vezetett öröklődő kópiaszám-eltérés azonosításához, amely magyarázatul szolgált volna az MDS/AML családi halmozódására. **A:** Az első család esetében három fiatal testvérben alakult ki hypocelluláris MDS a szülők érintettsége nélkül, míg **B:** a másik család esetében két generáció négy tagjában jelent akut myeloid leukémia. A négyzetek a férfiakat, a körök a nőket, az áthúzás az elhunyt személyeket jelöli.

#### Familiáris myeloid kórképek kapcsán tett kiemelt megfigyeléseink:

- Elsőként térképeztük fel több hazai myeloid malignitás halmozódását mutató család genetikai háttérét, melyek egy részében sikeresen azonosítottuk a hajlamosító csíravonalbeli genetikai eltérést.
- Elsőként azonosítottuk a JAK-STAT addikció jelenségét és progresszív fenotípussal való társulását a *RUNX1* mutáns FPD-AML esetében.
- Elsőként azonosítottuk a 7-es monoszómiával bíró MDS esetében a csíravonalbeli *GATA2* mutációk és a szomatikus *ASXL1* mutációk együttes előfordulását és progresszív fenotípussal való társulását.

## VI MEGBESZÉLÉS

Az értekezésben bemutatott eredmények a jelölt és munkacsoportjának az elmúlt évtizedben az onkohematológiai kórképek genetikai jellemzése terén tett legfőbb megfigyeléseit foglalják össze. A legkorszerűbb teljes genom-, exom- és panel-szekvenálásokat is magába foglaló új-generációs szekvenálási technológiák mellett hagyományos patológiai eljárásokkal is végzett kísérletek négy vizsgált onkohematológiai entitás mindegyikében új eredményeket szolgáltatottak az öröklődő és szerzett genetikai eltérések vonatkozásában. Ezen eredmények új biomarkerek azonosítását, a klonális evolúció mechanizmusainak genom-szintű megismerését, terápia-rezisztenciával kapcsolatba hozható mutációk felfedezését, hajlamosító genetikai variánsok és kooperáló genetikai mechanizmusok azonosítását, valamint a gén- és fehérje-szintű mutációs allélterhelés klinikai jelentőségének feltárását is magukban foglalják. Az eredmények társadalmi hasznosulását jelzi, hogy a nagyszámú hazai onkohematológiai beteg genetikai jellemzése mellett számos, a jelölt kutatócsoportja által meghonosított és ma már a mindennapi molekuláris onkohematológiai diagnosztikában alkalmazott eljárás, valamint egy új kezelési lehetőség hazánkban való megjelenésének is alapjául szolgáltak az értekezésben bemutatott megfigyelések.

Az egyik leggyakoribb B-sejtes lymphoma, az FL várható túlélése az anti-CD20 terápia megjelenésével jelentősen javult és a betegség transzformációjának kumulatív gyakorisága is a korábbi 30%-ról megközelítőleg 10%-ra csökkent [214]. Mindazonáltal a továbbra is gyógyíthatatlan betegséggént számon tartott FL esetében a korai relapszusok mellett a betegség transzformációja jelenti a legkomolyabb klinikai kihívást. Az NGS érát megelőzően több tanulmány is próbálta azonosítani a transzformáció háttérében álló genetikai eltéréseket egyedi gének, illetve kromoszóma-régiók szintjén, melynek köszönhetően számos eltérés (többek között a *p15*, *p16*, *TP53* és *C-MYC* gének mutációi, valamint 6p, 16p, 12q és 1p36 kromoszóma-régiók kópiaszám-változásai) lehetséges szerepe merült fel [55, 56, 215-220]. Kutatásaink során elsőként térképeztünk fel e kedvezőtlen kimenetellel járó esemény háttérében álló genetikai eltéréseket teljes genom-szinten, korszerű NGS vizsgálatok alkalmazásával [202]. Az epigenetikai gépezet bizonyos komponenseinek mutációit (*MLL2*, *CREBBP*, *EZH2*), a BCR és NFκB jelátvitelben (*TNFAIP3*, *CARD11*, *MYD88*), valamint a B-sejt fejlődésben (*EBF1*) szereppel bíró faktorok eltéréseit tanulmányunkat követően további kutatócsoportok is igazolták [221, 222]. A transzformáció jelenségét vizsgáló tanulmányok legfontosabb megállapítása, hogy egyetlen kritikus genetikai lézió helyett a folyamat háttérében

a fentebb említett mechanizmusok és útvonalak komponenseit érintő pontmutációk és kópiaszám-eltérések gyakoriságának emelkedése, valamint a BCR jelátvitelben és B-sejt fejlődésben szereppel bíró molekulák genetikai eltéréseinek megjelenése jellemzi az FL transzformációjának folyamatát [202, 221].

Evolúciós szempontból eredményeink megerősítették a korábban elsőként Matolcsy és mtsai. által felvetett [223], majd mások által is támogatott [224] közös progenitor klón koncepció relevanciáját, valamint a genom-szintű adatok segítségével definiáltuk a CPC populációból induló divergens evolúció mintázatait és a CPC populációk genetikai összetételét. Ezen eredmények alapján a CPC populáció számos célozható genetikai eltérést (epigenetikai gépezet, B-sejt jelátvitel, JAK-STAT jelátvitel, NFκB jelátvitel) hordoz az esetek túlnyomó többségében, amelyek számos célzott terápiás lehetőséget rejtenek. Mindehhez azonban racionálisan tervezett, molekuláris biomarkerekre épülő klinikai tanulmányok szükségesek a közeljövőben.

Ennek első kiváló példáját szolgáltatja az EZH2 hiszton-metiltranszferáz, amely mutációinak 2010-ben történt felfedezését követően ma már klinikai tanulmányokban vizsgálják az első szelektív EZH2 gátlók szerek hatékonyságát FL-ben [225]. Az *EZH2* mutációkról szóló első tanulmány jelentősen alábecsülte a mutációk gyakoriságát FL-ben (7%), és funkcióvesztéses mechanizmust sugallt az elvégzett funkcionális tanulmányok eredményei alapján [27]. Munkánk során elsőként mutattunk rá arra, hogy az *EZH2* Y646 mutációk esetében nem valószínű a funkcióvesztéses mechanizmus [30], amit a fokozott H3K27 trimetilációval járó funkciónyeréses mechanizmus bizonyítása követett két munkacsoport által [28, 29]. Az *EZH2* mutációk felfedezéséről beszámoló közleményben szereplő 7%-os mutációs gyakorisággal szemben a nagy érzékenységű NGS-sel végzett saját vizsgálataink alapján az *EZH2* mutációk gyakorisága 27%-nak adódott [31]. Továbbá, az NGS adatok klonalitás vizsgálatával bizonyítottuk, hogy az *EZH2* mutációk az esetek döntő többségében korai, klonális és a betegség lefolyása során stabil biomarkernek tekinthetők [31]. Green és mtsai. hasonló következtetésre jutottak további epigenetikai szabályozók mutációi kapcsán is [226]. Ezen megfigyeléseinknek köszönhetően a DLBCL mellett az FL is ideális entitásként jelent meg az első szelektív EZH2 gátlók szerek klinikai kipróbálására [227, 228]. Ezek közül a tazemetostat már előrehaladott II-es fázisú klinikai tanulmányokban mutat ígéretes eredményeket többszörösen relabált, *EZH2* mutáns FL betegekben (objektív válasz arány 71% az *EZH2* mutáns betegcsoportban szemben a 33%-os válaszaránnyal az *EZH2* vad típusú betegekkel) [44]. Az értekezésben bemutatott eredményeken túl egy multicentrikus hazai betegcsoport (n=340) esetében is elvégeztük az *EZH2* mutációk gyakoriságának

meghatározását, ami 20%-nak adódott [33]. Ezen adataink további három nemzetközi centrum (Barts Cancer Institute, London; Institute Gustave Roussy, Párizs; Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York) adataival kiegészítve egy közel 1000 fős kohorszban 21%-os *EZH2* mutációs gyakoriságot mutattak, valamint demonstrálták, hogy az *EZH2* mutáció pozitivitás nem hozható kapcsolatba kedvezőbb klinikai lefolyással ([Bödör és mtsai, EHA 2019](#)). Eredményeink hasznosulását jelzi, hogy előreláthatóan még az idei évben több hazai centrumban is lehetőség nyílik a tazemetostat hatásosságának tesztelésére klinikai tanulmány keretein belül, így a hazai FL betegek is várhatóan profitálhatnak ebből az új célzott terápiás lehetőségből. Későbbi vizsgálataink kiterjedtek a betegség egyik ritka variánsára, a cutan FL-re is, amely során azonban az *EZH2* gén érintettségével szemben az 1p36 régió és a *TNFRSF14* gén eltéréseit azonosítottuk [229]. Az epigenetikai gépezetet érintő mutációkon túl, kollaboráció formájában részt vettünk az mTOR útvonal komponenseit (*RRAGC*, *ATP6V1B2* és *ATP6API*) érintő mutációk felfedezésében is, amelyek az FL közel 20%-ában fordulnak elő [35] és felvetik a B-sejtes lymphomák esetében korábban már tesztelt különböző mTOR gátlószerek újrapozícionálását a betegek mutációs státuszának fényében [230].

Az elmúlt években megjelent új terápiás lehetőségek alapvetően változtatták meg a másik általunk vizsgált B-sejtes entitás, a krónikus lymphocytás leukémia kezelési paradigmáját: a hagyományos kemoimmuno-terápiára refrakter vagy rezisztens betegek esetében ma már akár elsővonalon is rendelkezésre állnak jelátviteli gátlószerek. Munkánk során a CLL kezelésében elsőként megjelenő ilyen molekula, a BTK gátló ibrutinibnek a betegség szubklonális architektúrájára kifejtett hatását vizsgáltuk, a közlés idejében a legnagyobb esetszámú és leghosszabb követési idővel bíró, klinikai tanulmányon kívüli ún. „real-world” betegcsoport esetében [203]. Eredményeink alapján a kemoimmuno-terápia hatására korábban már dokumentált klonális szelekció folyamata az ibrutinib kezelés hatására is fennáll és további klonális diverzifikációt eredményez. A gyógyszer szelektív nyomásának hatására kialakuló dinamikus klonális szelekciót írtunk le az előkezelt betegcsoportban megfigyelhető jelentős szubklonális heterogenitás talaján, egyedi mutációs mintázatokat azonosítva szinte valamennyi betegben. Ugyanakkor a klasszikus kemoimmuno-terápiával szemben egyetlen, a CLL patogenezisében eddig ismert célgén mutációi sem mutattak szelektív rátermettséget a gyógyszer szelekciós nyomásának hatására. A szinte valamennyi vizsgált génben megjelenő szubklonális mutációk magas aránya megegyezik Nadeu és mtsai. [205], valamint Leeksa és mtsai. [231] megfigyeléseivel is, amelyek a szubklonális heterogenitás mértékének fokozódásáról számoltak be kezelésen átesett CLL-es betegek esetében.



Bár az ibrutinib hatása független a *TP53* aberrációk jelenlététől, a *TP53* eltéréseket hordozó betegek esetében gyakrabban figyeltek meg relapszust ibrutinib kezelés során [232]. Kutatásaink során rendkívül változatos klonális dinamikát tártunk fel a *TP53* mutációk tekintetében. Míg bizonyos esetekben klonális expanziót vagy eliminációt figyeltünk meg, más esetekben az eredeti *TP53* mutáns szubklón eliminációja mellett az eredetitől független újabb *TP53* mutáns szubklón megjelenését dokumentáltuk. Egy új mechanizmust azonosítottunk a *TP53* és *BTK* mutációk vonatkozásában, amely során a két gént érintő mutációk alternáló klonális dinamikáját figyeltük meg: a *BTK* mutációk döntő többsége a *TP53* mutáns szubklón redukcióját vagy eliminációját követően jelent meg, egyetlen esetben sem figyeltük meg *BTK* mutációk kialakulását perzisztáló vagy klonális expanziót mutató *TP53* mutáns szubklón esetében. Bár ezen megfigyeléseink mások általi megerősítése még várat magára, elképzelhető, hogy a *BTK* mutáns szubklónok expanziójának előfeltétele a *TP53* mutáns szubklón eliminációja azokban az esetekben, ahol a két gén mutációi együttesen fordulnak elő. Alternatív forgatókönyv szerint az is elképzelhető, hogy a hosszú ideig fennálló ibrutinib kezelés (eseteinkben 2,5-3 év) egyszerűen új „niche”-t hoz létre a *BTK* mutációk számára a *TP53* mutáns szubklónok graduális eliminációja által [203].

A látványos kezelési eredmények ellenére a különböző klinikai tanulmányokban a betegek mintegy 20%-ánál szekunder ibrutinib rezisztencia kialakulásáról számoltak be, amely háttérben az esetek döntő többségében a *BTK* vagy *PLCγ2* gének mutációit azonosították [98-100]. Saját, „real-world” adataink arra utalnak, hogy szemben a klinikai tanulmányok jól válogatott beteganyagával, a valós klinikai gyakorlatban az előzetes kezelésben részesülő betegek esetében gyakrabban alakulhat ki ibrutinib rezisztencia a szerzett *BTK* vagy *PLCγ2* mutációk következtében. Az általunk vizsgált betegcsoportban 36,5 hónapos medián követési idő alatt a betegek 35%-ában (7/20) alakult ki relapszus. Hasonló megfigyeléseket tett két további munkacsoport is klinikai tanulmányon kívüli betegek mintáit vizsgálva [233, 234].

A *BTK* és *PLCγ2* mutációk időbeli dinamikáját vizsgálva kimutattuk, hogy a rezisztenciával kapcsolatba hozható mutációk a klinikai relapszus kialakulása előtt átlagosan 10,5 hónappal megjelennek a betegek keringésében és az esetek túlnyomó többségében prediktív markerei a később bekövetkező terápiás kudarcnak. Ezen megfigyelések alapját képezik egy a mindennapi diagnosztikában is alkalmazható monitorozási algoritmusnak, amely során az ibrutinib kezelés alatt álló betegek rendszeres monitorozását végezzük érzékeny NGS és ddPCR technológiákkal, keresve az optimális mintavételi időpontokat, valamint a klinikum számára is relevanciával bíró mutáns allélfrekvencia határértékeket, amelyek informálhatják a

jövőben a klinikusokat a kezelési stratégia módosításának szükségességéről. Az értekezésben bemutatott eredményeken túl, mára több mint 200 ibrutinibbel kezelt beteg sorozatmintáin végzünk vizsgálatokat, és a legalább 18 hónapja kezelés alatt álló betegek esetében közel 40%-os *BTK* mutációs gyakoriságot figyeltünk meg (*közlés alatt álló megfigyelés*).

Az általunk dokumentált térbeli konvergens evolúció jelensége felhívja a figyelmet a különböző érintett anatómiai lokalizációk esetében elvégzendő mutáció-analízis jelentőségére, amit alátámaszt Nadeu és mtsai. későbbi megfigyelése is [235], miszerint bár a CLL diagnózisakor minimális térbeli heterogenitás figyelhető meg, a kezelésekre hatására jelentős térbeli klonális diverzifikáció zajlik, aminek feltérképezése kiemelt jelentőséggel bírhat a kialakuló rezisztencia hátterében álló molekuláris mechanizmusok megértése és következményesen a további terápiás stratégia tervezésének szempontjából is.

A daganatok molekuláris szintű feltérképezésének új dimenzióját jelentik az egysejt-szintű analízisek, amelyek segítségével korábban nem látott felbontással lehetséges a genetikai és epigenetikai folyamatok vizsgálata. Az ibrutinib kezelés hatására kialakuló molekuláris változások vizsgálatát (az értekezésben bemutatott eredményeken túlmutatóan) egy nemzetközi kollaboráció formájában nagyszámú egyedi sejt teljes génexpressziós analízisével és teljes genomra kiterjedő kromatinszerkezet-térképezéssel, valamint komplex bioinformatikai elemzést és mesterséges intelligenciát is magában foglaló eljárásokkal vizsgáltuk tovább, amely során azonosítottuk az ibrutinib kezelés hatására kialakuló korai molekuláris változásokat egyedi sejtek szintjén [236].

A CLL-t érintő kutatásaink fontos eleme volt a betegséghez kapcsolódó molekuláris diagnosztika fejlesztése is, amely a saját tervezésű multigén NGS panel és a *BTK* mutációk monitorozására alkalmas ddPCR kidolgozásán túl több száz hazai beteg *TP53* és *IGHV* mutációs státuszának feltérképezésében is megnyilvánult [69, 206]. Ezen erőfeszítések eredményeképpen hazánk teljes jogú tagjává vált az [Európai CLL kutatóhálózat](#) (ERIC: „European Research Initiative on CLL”) [TP53](#) és [IGHV](#) munkacsoportjainak, és az elmúlt két évben több száz hazai CLL-es beteg számára nyílt lehetőség európai akkreditáció birtokában az ibrutinib elsővonalbeli alkalmazásához szükséges biomarker-vizsgálatok elvégzésére laboratóriumunkban.

A Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák kialakulásának hátterében álló driver mutációk megismerésére az elmúlt tizenöt évben került sor. Mára a *JAK2*, *MPL* és *CALR* mutációk kimutatása a betegségcsoport major diagnosztikus kritériumává vált és hazánkban is évek óta a mindennapi molekuláris diagnosztikai algoritmusok részét képezi

[237-239]. Számos tanulmány foglalkozott azóta ezen driver gének mutációs státusza és a betegek kórlefolyása, valamint különböző klinikai és laboratóriumi paraméterei közötti összefüggések meghatározásával [136, 149]. Az elmúlt években a mutációs státusz ismeretén túl a mutációt hordozó klón méretére utaló mutáns alléltömeg (vagy variáns allélfrekvencia) klinikai relevanciája is ismertté vált [134, 144]. (Ennek jelentőségét az FL-lel és CLL-lel foglalkozó tanulmányaink esetében is demonstráltuk fentebb.) Munkánk során 652 Ph- MPN beteg (425 ET és 227 PMF) esetében végeztük el a *JAK2* V617F és *CALR* driver mutációk mennyiségi mutáció-analízisét. Az általunk vizsgált betegcsoport diagnózisai három hazai patológiai centrumban születtek, a betegek ugyanakkor tíz különböző hazai klinikai centrumból származtak. Dr. Andrikovics Hajnalka kutatócsoportjának hasonló jellegű munkáját is figyelembe véve [149, 237] szinte a teljes hazai Ph- MPN populáció genetikai profilja ismert.

Míg a mutációs státusz és a *JAK2* V617F alléltömeg klinikai jelentőségének vonatkozásában megfigyeléseink döntően a nemzetközi adatok hazai betegcsoportban történő megerősítését jelentik [140, 240], a *CALR* mutációk tekintetében számos új megfigyelést tettünk [207, 208]. Tizenkét, korábban még nem azonosított új *CALR* mutációt fedeztünk fel, és a magas *CALR* mutáns allélterhelést egy proliferatívabb betegség-fenotípussal (magasabb LDH-szint, gyakoribb myelofibrotikus transzformációs ráta és gyakoribb thrombotikus események) hoztuk összefüggésbe ET esetében [207]. Bár a mutáns allélterhelés meghatározásához alkalmazott metodikák esetében nemzetközi standardizáció szükséges, a *JAK2* V617F és *CALR* mutációk mennyiségi meghatározása fontos prognosztikus biomarkerévé válhat a Ph- MPN kórképek követésének akár a *JAK2* gátló célzott terápiák hatásának nyomonkövetésében, vagy a HSCT-t követő reziduális betegség kimutatásában is [241, 242]

Munkánk során elsőként terjesztettük ki a *CALR* mutáns allélterhelés vizsgálatát fehérje-szintre: a CAL2 monoklonális antitest [130] segítségével lehetőségünk nyílt a *CALR* mutációk fehérje-szintű mennyiségi meghatározására az ezidáig vizsgált legnagyobb betegcsoport, összesen 91 *CALR* mutációt hordozó ET vagy PMF beteg esetében. Tizennyolc különböző típusú *CALR* mutáció esetében demonstráltuk az IHC eljárás alkalmazhatóságát a mutációs státusz meghatározásában, amelyek közül 16 mutáció-típus esetében tanulmányunkat megelőzően még nem történtek vizsgálatok. A CAL2 IHC analízis 100%-os konkordanciát mutatott a molekuláris vizsgálattal meghatározott *CALR* mutációs státusz adatokkal. A fehérje-szintű allélterhelés meghatározásához manuális és automatizált eljárásokat is kidolgoztunk, amelyek 100%-os specificitással és szenzitivitással voltak képesek elkülöníteni a *CALR* mutáns és vad típusú eseteket. Bár a specifikus CAL2 jelölődés döntően a megakaryocytákra

lokalizálódott, az esetek mintegy felében non-megakaryocita sejtekben is megfigyeltünk specifikus festődést, amire magyarázatul szolgálhat az a jelenség, hogy a *CALR* mutációk gyakran jelennek meg olyan korai progenitor sejtekben, amelyek erythroid és myeloid irányba is képesek differenciálódni [123]. A fehérje-szintű *CALR* mutáns allélterhelés csak a thrombotikus események gyakoribb kialakulásával mutatott szignifikáns ( $p=0,03$ ) összefüggést, ami azonban egy klinikailag releváns megfigyelés lehet, mivel korábban ugyanezt az összefüggést azonosítottuk magasabb DNS-szintű *CALR* mutációs allélfrekvencia esetében is [207]. Kiemelendő, hogy a *CALR* mutációk mennyiségi meghatározására általunk kidolgozott IHC eljárás hasznos eszköz lehet az ET és PMF betegek mindennapi diagnosztikájában is, olyan esetekben amikor nincs lehetőség molekuláris szintű analízisre, vagy annak eredménye valamilyen okból kifolyólag nem egyértelmű.

Bár az elmúlt évtizedben végzett kutatásaink döntően a különböző onkohematológiai kórképek kialakulása és progressziója során szerzett, azaz szomatikus genetikai eltérések megismerésére fókuszáltak, a myeloid kórképek esetében tanulmányaink az öröklődő hajlamosító genetikai variánsok vizsgálatára is kiterjedtek. Annak ellenére, hogy az onkohematológiai kórképek családon belüli halmozódása több évtized óta ismert jelenség, a hajlamosító genetikai háttér feltérképezése ezidáig a tudományos megfigyelések és anekdotikus beszámolókon túlmutató részletességgel csak a myeloid kórképek csoportjában történt meg. Ennek megfelelően az elmúlt évtizedben robbanásszerű fejlődés szemtanúi lehettünk ezen a téren, ami egy új entitáscsoport, a „myeloid neopláziák germline hajlamosító tényezővel” megjelenéséhez vezetett a myeloid daganatok 2016-os megújult osztályozásában.

E kórképcsoportban végzett munkánk legfontosabb gyakorlati hozadéka, hogy elsőként azonosítottuk és genetikai vizsgálatokat végeztünk hazai familiáris myeloid kórképek által érintett családok esetében, valamint a ma ismert legfontosabb hajlamosító variánsokat hordozó gének pontmutációinak és kópiaszám-eltéréseinek vizsgálatára alkalmas eljárásokat dolgoztunk ki és honosítottunk meg a mindennapi molekuláris diagnosztikai gyakorlatban. Négy hazai és egy angol család vizsgálata során három család esetében sikerült azonosítani a hajlamosító genetikai variánst a *RUNX1*, *GATA2* és *TERC* gének germline pontmutációi vagy kópiaszám-eltéréseinek formájában.

Az eddig azonosított legtöbb elsőfokú érintett rokont tartalmazó FPD-AML család esetében, ahol négy leány testvérnél alakult ki megelőző MDS talaján szekunder AML, a *RUNX1* gén p.R201\* stop kodont eredményező mutációját azonosítottuk mind a négy érintett gyermekben és tünetmentes hordozó édesanyjukban is. Új kooperáló genetikai mechanizmust

fedeztünk fel e család exom-szintű genetikai vizsgálata során a JAK-STAT addikció formájában, amely során valamennyi, agresszív kórlefolyást mutató érintett esetében e jelátvitel komponenseinek (*JAK2* vagy *SH2B3*) mutációit és azok aUPD következtében homozigótává válását dokumentáltuk, ami a germline háttér megismerésének fontosságán túl a szerzett kooperáló genetikai eltérések azonosításának jelentőségére is felhívja a figyelmet. A másik általunk azonosított gyakori genetikai konstelláció a germline *GATA2* mutáns, 7-es kromoszóma monoszómiájával kísért magas rizikójú MDS esetében a szomatikus *ASXL1* mutációk megjelenése. A csíravonalbeli *GATA2* mutációk és agresszív kórlefolyással társuló szerzett *ASXL1* mutációk gyakori együttállását West és mtsai. is megerősítették tanulmányunkat követően [243]. A dolgozatban bemutatott eredményeken túlmutatóan a szóban forgó *GATA2*-deficiens család esetében megfigyelt variábilis penetrancia háttérében nemzetközi kollaboráció során a mutáns *GATA2* allélspecifikus csendesítését és a vad típusú allél szelektív kifejeződését figyeltük meg a *GATA2* mutációt hordozó, ám myeloid betegség jeleit nem mutató családtagokban [244].

A genetikai háttér folyamatos megismerésével a korábban irodalmi ritkaságnak vélt, de a mai vizsgálatokkal felismert familiáris esetek gyakorisága folyamatosan növekszik. Az ilyen esetek azonosításának egyik jelentős gyakorlati aspektusa a tünetmentes hordozó családtagok azonosítása a csontvelődonor keresés során [153]. Az általunk vizsgált családok közül kettő esetében is az azonosított csíravonalbeli eltérés szűrése zárta ki vagy tette lehetővé egy elsőfokú rokon donorként való azonosítását a HSCT-re való előkészület során. Az eddig azonosított csíravonalbeli hajlamosító genetikai variánsok klinikai tesztelésére az elmúlt években több nemzetközi ajánlás is született, amelyek a specifikus tüneteket is figyelembe véve, a klinikai képen alapuló diagnosztikai algoritmus kidolgozását célozták [245-248]. Kutatócsoportunk is közölt egy hazai algoritmus javaslatot a közlés időpontjában ismert genetikai eltérések kontextusában [183]. Ugyanakkor az elmúlt néhány évben további génekben megtalálható hajlamosító genetikai variánsok azonosításának lehattunk tanúi, ami a genetikai vizsgálatokhoz szükséges metodikai eszköztár bővítését is szükségessé teszi. Kutatócsoportunk fejlesztésének köszönhetően napjainkban a kópiaszám-eltérések vizsgálatára alkalmas MLPA eljárás túl egy saját fejlesztésű, 52 gén mutációinak és kisméretű kópiaszám-eltéréseinek vizsgálatára alkalmas NGS eljárás áll rendelkezésre a myeloid kórképek halmozódását mutató családok genetikai vizsgálatához.

A ma ismert predispozíciós gének vizsgálatával az esetek mintegy felében sikerül azonosítani a hajlamosító genetikai variánst, így jelentős nemzetközi szintű erőfeszítés zajlik további kandidáns gének azonosításának céljából. A jelen pillanatban legnagyobb ilyen típusú

nemzetközi összefogásra épülő tanulmányban kollaborációs partnerként vettünk részt, amely 86 család exom-szintű vizsgálatával 65 újabb predispozíciós lókuszt azonosított [249]. A familiáris myeloid kórképek területén végzett kutatómunkánk további nemzetközi folyamánya a [Runx1 kutatói hálózatban](#), a GATA2 deficienciához köthető malignitásokat vizsgáló ERA-PerMed [GATA2-konzorciumban](#), valamint a gyermekkori MDS és AML-lel foglalkozó szakembereket tömörítő [EWOG-MDS csoport](#) molekuláris diagnosztikai paneljében való tagság is. Ezen aktivitásoknak köszönhetően, nemzetközi összefogás keretén belül még hatékonyabban vizsgálhatók a ritka, ám klinikailag is jelentős és modellértékű familiáris myeloid kórképek.

Az elmúlt évek eredményeinek tudományos közlésén túl fontosnak tartottuk a tudományos megfigyelések magyar nyelvű, a posztgraduális is képzésben is hasznosuló formában történő disszeminációját is. Ennek megfelelően az általunk vizsgált onkohematológiai entitások témájában, saját eredményeinket is a mindennapi gyakorlat kontextusába helyezve számos összefoglaló közlemény készült az onkohematológia szakterületének művelői számára a területen alkalmazott molekuláris vizsgálómódszerekről [182, 212, 250], az FL és DLBCL genetikai háttéréről és új kezelési lehetőségeiről [33, 251-253], a CLL genetikai háttéréről az új genomszekvenálási eredmények fényében [75], a CLL korszerű kezeléséről és molekuláris diagnosztikai algoritmusáról [92], az ibrutinib rezisztencia mechanizmusairól és klinikai jelentőségéről [103], a driver gének mutációi mellett megjelenő fenotípus módosító genetikai eltérések szerepéről Ph- MPN-ákban [254], valamint a familiáris onkohematológiai kórképek diagnosztikus aspektusairól [104, 183].

## VII ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A doktori tézisek alapjául szolgáló tudományos publikációkban a jelölt és munkacsoportja számos, a mindennapi klinikai és diagnosztikai gyakorlatban is relevanciával bíró új megállapítást tett.

A tézisek legfontosabb új megállapításai:

- A follicularis lymphoma (FL) transzformációjának hátterében az epigenetikai gépezet komponenseinek, a JAK-STAT és NFκB útvonalak, valamint a B-sejt fejlődésben szerepet játszó fehérjék gyakori mutációit azonosítottuk (*Nature Genetics* 2014).
- Célozható genetikai léziókat azonosítottunk az FL újabb relapszusainak és transzformációjának rezervoárjaként azonosított közös progenitor sejtekben (*Nature Genetics* 2014).
- Korai, klonális eseményként, így ideális terápiás célpontként azonosítottuk az *EZH2* mutációkat az FL betegek mintegy negyedében (*Leukemia* 2011, *Blood* 2013).
- Ibrutinib kezelés hatására kialakuló heterogén klonális evolúciós mintázatokat és folyamatos klonális szelekciós folyamatot azonosítottunk ezen típusú kezelés alatt álló krónikus lymphocytás leukémiában (CLL) szenvedő betegek esetében (*International Journal of Cancer* 2020).
- Az ibrutinib rezisztencia hátterében több újonnan felfedezett *BTk* és *PLCγ2* mutációt azonosítottunk és kimutattuk, hogy a *BTk* rezisztencia mutációk a klinikai relapszus előtt akár 12 hónappal is megjelenhetnek a betegek keringésében (*International Journal of Cancer* 2020).
- Ibrutinib hatására kialakuló térbeli konvergens evolúciós folyamatot azonosítottunk CLL-ben (*Haematologica* 2019).
- 12 új, korábban még nem közölt *CALR* mutációt azonosítottunk Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziákban (Ph- MPN) (*Leukemia Research* 2018).

- A magas *CALR* mutáns alléltömeg összefüggését mutattuk ki egy proliferatívabb betegség fenotípussal, fokozott thrombotikus és myelofibrotikus transzformációs rizikóval esszenciális thrombocythaemia esetében (*Leukemia Research* 2018).
- A *CALR* mutációk fehérje-szintű mennyiségi kimutatására alkalmas eljárást dolgoztunk ki és összefüggést mutattunk ki a magas *CALR* alléltömeg és a major thrombotikus események előfordulása között (*Pathology* 2019).
- Elsőként azonosítottunk olyan hazai családokat, amelyek myeloid hematológiai kórképek halmozódását mutatták. Kidolgoztuk és elérhetővé tettük a betegségcsoport mindennapi diagnosztikájához szükséges molekuláris eljárásokat (*Pathology Oncology Research* 2018, *Hematológia Transzfuziológia* 2019).
- A familiáris vérlemezke zavar – akut myeloid leukémia (FPD-AML) kórképre hajlamosító germline *RUNX1* mutációkkal kooperáló genomi változásokat azonosítottunk a JAK-STAT útvonal komponenseiben (JAK-STAT addikció) egy FPD-AML modell család esetében (*European Journal of Human Genetics* 2017).
- Felfedeztük a csíravonalbeli *GATA2* mutációk, valamint a szerzett 7-es kromoszóma monoszómia és *ASXL1* mutációk kooperációját a magas rizikójú familiáris myelodysplasias szindróma hátterében (*Haematologica* 2012).



## VIII AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

### VIII.1 A jelölt első- vagy utolsószerzős közleményei az értekezés témájában

1. **Bödör C**, O’Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H, Drexler HG, Montoto S, Lister AT, Gribben JG, Matolcsy A, Fitzgibbon J. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *LEUKEMIA* 25:(4), 726-729. (2011). **IF: 9,561**
2. **Bödör C**, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O’Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J, Lee AM, Clear A, Montoto S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA, Elemento O, Hills R, Gribben JG, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T, Gascoyne RD, Fitzgibbon J. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *BLOOD* 122:(18), 3165-3168. (2013). **IF: 9,775**
3. Okosun J\*§, **Bödör C**\*§, Wang J\*, Araf S, Yang C-Y, Pan C, Boller S, Cittaro D, Bozek M, Iqbal S, Matthews J, Wrench D, Marzec J, Tawana K, Popov N, O’Riain C, O’Shea D, Carlotti E, Davies A, Lawrie CH, Matolcsy A, Calaminici M, Norton A, Byers RJ, Mein C, Stupka E, Lister TA, Lenz G, Montoto S, Gribben JG, Fan Y, Grosschedl R, Chelala C, Fitzgibbon J. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *NATURE GENETICS* 46:(2), 176-181. (2014). \* megosztott első szerzők, § megosztott levelező szerzők. **IF: 29,352**
4. Kiss R, Alpár D, Gángó A, Nagy N, Eyüpoglu E, Aczél D, Matolcsy A, Csomor J, Mátrai Z, **Bödör C**. Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *HAEMATOLOGICA* 104:(1), E38-E41. (2019). **IF: 7,570**
5. Gángó A, Alpár D, Galik B, Marosvári D, Kiss R, Fésüs V, Aczél D, Eyüpoglu E, Nagy N, Nagy A, Krizsán S, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Ádám E, Tasnády S, Réti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Mátrai Z, **Bödör C**. Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER* 146:(1), 85-93. (2020). **IF: 4,982**
6. **Bödör C**, Renneville A, Smith M, Charazac A, Iqbal S, Etancelin P, Cavenagh J, Barnett MJ, Kramarzova K, Krishnan B, Matolcsy A, Preudhomme C, Fitzgibbon J, Owen C. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *HAEMATOLOGICA* 97:(6), 890-894. (2012). **IF: 5,935**

7. Tawana K, Wang J, Király P, Kállay K, Benyó G, Zombori M, Csomor J, Al Seraihi A, Rio-Machin A, Matolcsy A, Chelala C, Cavenagh J, Fitzgibbon J, **Bödör C**. Recurrent somatic JAK-STAT pathway variants within a RUNX1-mutated pedigree. *EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS* 25:(8), 1020-1024. (2017). **IF: 3,636**
8. Király AP, Kállay K, Gángó A, Kellner Á, Egyed M, Szőke A, Kiss R, Vályi-Nagy I, Csomor J, Matolcsy A, **Bödör C**. Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 24: (1), 83-88. (2018). **IF: 2,433**
9. Gángó A, Mózes R, Boha Z, Kajtár B, Timár B, Király PA, Kiss R, Fésüs V, Nagy N, Demeter J, Körösmezey G, Borbényi Z, Marton I, Szőke A, Masszi T, Farkas P, Várkonyi J, Plander M, Pósfai E, Egyed M, Pál K, Radványi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpár D, **Bödör C**. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *LEUKEMIA RESEARCH* 65, 42-48. (2018). **IF: 2,066**
10. Mózes R, Gángó A, Sulák A, Vida L, Reiniger L, Timár B, Krenács T, Alizadeh H, Masszi T, Gaál-Weisinger J, Demeter J, Csomor J, Matolcsy A, Kajtár B, **Bödör C**. Calreticulin mutation specific CAL2 immunohistochemistry accurately identifies rare calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *PATHOLOGY* 51:(3), 301-307. (2019). **IF: 3,163**

*Magyar nyelvű közlemények az értekezés témájában*

11. Fésüs V, Marosvári D, Kajtár B, Király PA, Demeter J, Gurbity-Pálfi T, Egyed M, Plander M, Farkas P, Mátrai Z, **Bödör C**. A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában [TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia] *ORVOSI HETILAP* 158(6), 220-228. (2017). **IF: 0,322**
12. Kotmayer L, Kiss R, Király PA, Csomor J, Kállay K, Alpár D, **Bödör C**. Familiáris myelodysplasiás szindrómában szenvedő család genomikus kópiaszám-változásainak vizsgálata multiplex ligatiofüggő szondaamplifikációval. *Hematológia–Transzfuziológia* 51:(4), 214-220. (2018).
13. Fésüs V, Eyüpoglu E, Kiss R, Ádám E, Kozma A, Mátrai Z, **Bödör C**. Az IGHV mutációanalízis jelentősége krónikus lymphocytás leukémiában. *HEMATOLÓGIA–TRANSZFUZIOLÓGIA* 51:(1), 22-29. (2018).

A fenti közlemények összessített impakt faktora: **78,795**. Összesített idézettsége: **628**, független idézettsége: **550**.

*Összefoglaló közlemények az értekezés témájában*

14. **Bödör C**, Reiniger L. Catalog of genetic progression of human cancers: non-Hodgkin lymphoma. *Cancer and Metastasis Reviews* 35:(1), 109-127. (2016). **IF: 4,697**
15. **Bödör C**, Schneider T. Follicularis lymphoma– útban a személyre szabott és célzott kezelés felé. *KLINIKAI ONKOLÓGIA* 3:(1), 30-38. (2016).
16. **Bödör C**, Gángó A, Schneider T. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma: Úton a személyre szabott terápia felé. *KLINIKAI ONKOLÓGIA* 4:(1), 33-41. (2017).
17. Király AP, Alpár D, Fésüs V, Marosvári D, Matolcsy A, **Bödör C**. Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereinek alapjai. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 60:(2), 88-98. (2016).
18. Marosvári D, Alpár D, Király AP, Rajnai H, Reiniger L, **Bödör C**. A krónikus limfocitás leukémia genetikai háttere az újgenerációs szekvenálás korszakában. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 60:(2), 118-125. (2016).
19. Király PA, Kállay K, Marosvári D, Benyó G, Szőke A, Csomor J, **Bödör C**. Familiáris myelodysplasiás szindróma és akut myeloid leukaemia klinikai és genetikai háttere. *ORVOSI HETILAP* 157:(8), 283-289. (2016).
20. Mózes R, Gángó A, Boha Z, Csomor J, **Bödör C**. A driver és szubklonális mutációk szerepe a primer mielofibrózis patogenezisében. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 61:(1), 36-45. (2017).
21. Fésüs V, Nagy Á, Alpár D, **Bödör C**. Az adoptív sejtttranszfer sikere a hematológiában: a kiméra antigénreceptorral felruházott T-sejtek. *HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA* 52:(3), 178-187. (2019).
22. Kotmayer L, Kállay K, **Bödör C**. Örökletes hematológiai malignitások. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 64:(1), 43-55. (2020).

*Angol nyelvű könyvfejezet az értekezés témájában*

23. Strefford JC, Fitzgibbon J, Rose-Zerilli MJJ, **Bödör C**. The genetics of mature B-cell malignancies, 265-311. In: *The Genetic Basis of Haematological Cancers*, Eds: S Tosi and AG Reid, Wiley 2016.

## VIII.2 Az értekezés témájához kapcsolódó kollaborációs közlemények

### *Eredeti közlemények:*

1. Okosun J, Wolfson RL, Wang J, Araf S, Wilkins L, Castellano BM, Escudero-Ibarz L, Al Seraihi A, Richter J, Bernhart SH, Efeyan A, Iqbal S, Matthews J, Clear A, Guerra-Assunção J, **Bödör C**, Quentmeier H, Mansbridge C, Johnson P, Davies A, Strefford JC, Packham D, Barrans S, Jack A, Du M, Calaminici M, Lister TA, Auer R, Montoto S, Gribben JG, Siebert R, Chelala C, Zoncu R, Sabatini DM, Fitzgibbon J. Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma. NATURE GENETICS 48:(2), 183-188. (2016). **IF: 27,125**
2. Gángó A, Bátai B, Varga M, Kapczár D, Papp G, Marschalko M, Kuroli E, Schneider T, Csomor J, Matolcsy A, **Bödör C**, Szepesi Á. Concomitant 1p36 deletion and TNFRSF14 mutations in primary cutaneous follicle center lymphoma frequently expressing high levels of EZH2 protein. VIRCHOWS ARCHIV 473:(4), 453-462. (2018). **IF: 2,585**
3. Rendeiro AF, Krausgruber T, Fortelny N, Zhao F, Penz T, Farlik M, Schuster LC, Neme A, Tasnády Sz, Réti M, Mátrai Z, Alpár D\*, **Bödör C\***, Schmidl C\*, Bock C\*. Chromatin mapping and single-cell immune profiling define the temporal dynamics of ibrutinib response in CLL. NATURE COMMUNICATIONS 11:(1), 577. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14081-6>. (2020). **IF: 11,880**  
*\*megosztott szenior szerzők*
4. Al Seraihi A, Rio-Machin A, Tawana K, **Bödör C**, Wang J, Nagano A, Heward JA, Iqbal S, Best S, Lea N, McLornan D, Kozyra E, Wlodarski M, Niemeyer C, Scott H, Hahn C, Ellison A, Tummala H, Romualdo Cardoso S, Vulliamy T, Dokal I, Butler T, Smith M, Cavenagh J, Fitzgibbon J. GATA2 monoallelic expression underlies reduced penetrance in inherited GATA2-mutated MDS/AML. LEUKEMIA 32:(11), 2502-2507. (2018). **IF: 9,944**
5. Rio-Machin A, Vulliamy T, Hug N, Walne A, Tawana K, Cardoso S, Ellison A, Pontikos N, Wang J, Tummala H, Al Seraihi AFH, Alnajar J, Bewicke-Copley F, Armes H, Barnett M, Bloor A, **Bödör C**, Bowen D, Fenaux P, Green A, Hallahan A, Hjorth-Hansen H, Hossain U, Killick S, Lawson S, Layton M, Male AM, Marsh J, Mehta P, Mous R, Nomdedéu JF, Owen C, Pavlu J, Payne EM, Protheroe RE, Preudhomme C, Pujol-Moix N, Renneville A, Russell N, Saggat A, Sciuccati G, Taussig D, Toze CL, Uyttebroeck A, Vandenberghe P, Schlegelberger B, Ripperger T, Steinemann D, Wu J, Mason J, Page P, Akiki S, Reay K, Cavenagh JD, Plagnol V, Caceres JF, Fitzgibbon J, Dokal I. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. NATURE COMMUNICATIONS 11(1):1044. doi: 10.1038/s41467-020-14829-5 (2020). **IF: 11,878**

6. Kiss R, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, Bátai B, Mátrai Z, **Bödör C**, Alpár D. Genomikus kópiaszám-eltérések szűrése krónikus limfoid leukémiában multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval. HEMATOLOGIA-TRANSZFIZIOLOGIA 51:(1), 31-40. (2018).

*Összefoglaló közlemények:*

7. Bátai B, Lévai D, Gaál-Weisinger J, Balogh A, Gángó A, **Bödör C**, Nagy N. A személyre szabott terápia új lehetősége follicularis lymphomában – Az EZH2 hiszton metil-transzferáz gátlása. HEMATOLOGIA-TRANSZFIZIOLOGIA 51:(2), 61-70. (2018).
8. Kiss R, Kosztolányi S, Gángó A, Szuhai K, **Bödör C**, Alpár D. Multiplex ligatiofüggő szondaamplifikáció az onkohematológiai kutatásban és diagnosztikában. ORVOSI HETILAP 159:(15), 583-592. (2018). IF: 0,564
9. Aczél D, Mátrai Z, Kiss R, Balogh A, Illés S, **Bödör C**, Alpár D. Ibrutinibrezisztencia krónikus limfocitás leukémiában. HEMATOLOGIA-TRANSZFIZIOLOGIA 52:(2), 136-148. (2019).
10. Gurbity Pálfi T, Fésüs V, **Bödör C**, Borbényi Z. A krónikus lymphocytás leukaemia korszerű molekuláris diagnosztikája és kezelése az új célzott terápia korszakában. ORVOSI HETILAP 158:(41), 1620-1629. (2017). IF: 0,322

*Szerkesztőségi hozzászólás*

24. Mutsaers PGJ, van de Loosdrecht, AA, Tawana K, **Bödör C**, Fitzgibbon J, Menko FH. Highly variable clinical manifestations in a large family with a novel GATA2 mutation. LEUKEMIA 27:(11), 2247-2248. (2013).

*További szenior szerzős közlemények:*

1. **Bödör C**, Alpár D; Marosvári D, Galik B, Rajnai H, Bátai B, Nagy Á, Kajtár B, Burján A, Deák B, Schneider T, Alizadeh H, Matolcsy A, Brandner S, Storhoff J, Chen N, Liu M, Ghali N, Csala I, Bagó AG, Gyenesi A, Reiniger L. Molecular Subtypes and Genomic Profile of Primary Central Nervous System Lymphoma. JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY 79:(2), 176-183. (2020). **IF: 3,460**
2. Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I, Hegyi L, de Groot K, Király PA, Krizsán S, Kajtár B, Pikó H, Pajor L, Vojcek Á, Matolcsy A, Kovács G, Szuhai K, Savola S, **Bödör C\***, Alpár D\*. Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. MODERN PATHOLOGY, doi: 10.1038/s41379-019-0423-5. (2019). **IF: 6,365**  
\*megosztott utolsó szerzők

## IX TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK AZ MTMT2 ALAPJÁN

Bödör Csaba tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása  
MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.05.20)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	82	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	38	574	641
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	14	6	8
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>	---	5	516	608
összefoglaló közlemény	---	19	9	12
rövid közlemény	---	6	99	113
<b>II. Könyv</b>	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvrészlet</b>	7	---	---	---
idegen nyelvű	---	2	0	0
magyar nyelvű	---	4	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	1	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	1	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	1	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	89	1204	1382
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	90	---	1204	1382
<b>V. További tudományos művek</b>	5	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	1	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	16	18
Oltalmak, szabadalmak	---	0	0	0
<b>VI. Hivatkozott absztraktok<sup>5</sup></b>	2	---	6	6
<b>Összes hivatkozás<sup>1</sup></b>	---	---	1226	1406
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	17	---	---	---
<b>g index<sup>6</sup></b>	37	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikk száma <sup>2</sup>	15	655
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikk száma <sup>2</sup>	20	23
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2008) teljes tudományos folyóiratcikk száma	70	1184
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	67	1183
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	354	25,18%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	6
Jelentés, guideline	1	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő <sup>7</sup>	0	0

**Megjegyzések:**

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

Készült: 2020. május 20. 10:56

## X IRODALOMJEGYZÉK

1. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L: **Hematológiai betegségek atlasza**. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 2006.
2. Katsumura KR, Bresnick EH, Group GFM: **The GATA factor revolution in hematology**. *Blood* 2017, **129**(15):2092-2102.
3. Avellino R, Delwel R: **Expression and regulation of C/EBPalpha in normal myelopoiesis and in malignant transformation**. *Blood* 2017, **129**(15):2083-2091.
4. Sood R, Kamikubo Y, Liu P: **Role of RUNX1 in hematological malignancies**. *Blood* 2017, **129**(15):2070-2082.
5. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR: **Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms**. *Haematologica* 2017, **102**(1):7-17.
6. Kuppers R: **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis**. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(4):251-262.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J: **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**, 4th edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
8. Salles GA: **Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma**. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:216-225.
9. **B-cell Lymphomas (Version 5.2019)**  
[[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/b-cell\\_blocks.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/b-cell_blocks.pdf)]
10. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES: **The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms**. *Blood* 2016, **127**(20):2375-2390.
11. Kahl BS: **Follicular lymphoma: are we ready for a risk-adapted approach?** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017, **2017**(1):358-364.
12. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR, Hainsworth JD, Maurer MJ, Cerhan JR, Link BK, Zelenetz AD, Friedberg JW: **Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study**. *J Clin Oncol* 2015, **33**(23):2516-2522.
13. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E: **Follicular lymphoma international prognostic index**. *Blood* 2004, **104**(5):1258-1265.
14. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, Pott C, Kopp N, Murakami M, Horn H, Leich E, Moccia AA, Mottok A, Sunkavalli A, Van Hummelen P, Ducar M, Ennishi D, Shulha HP, Hother C, Connors JM, Sehn LH, Dreyling M, Neuberg D, Moller P, Feller AC, Hansmann ML, Stein H, Rosenwald A, Ott G, Klapper W, Unterhalt M, Hiddemann W, Gascoyne RD, Weinstock DM, Weigert O: **Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry**. *Lancet Oncol* 2015, **16**(9):1111-1122.
15. Gatto D, Brink R: **The germinal center reaction**. *J Allergy Clin Immunol* 2010, **126**(5):898-907; quiz 908-899.



16. Garcillan B, Figgett WA, Infantino S, Lim EX, Mackay F: **Molecular control of B-cell homeostasis in health and malignancy.** *Immunol Cell Biol* 2018, **96**(5):453-462.
17. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC: **Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas.** *Blood* 2012, **120**(11):2240-2248.
18. Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR: **A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex.** *Nature* 2004, **428**(6978):88-93.
19. Hua C, Zorn S, Jensen JP, Coupland RW, Ko HS, Wright JJ, Bakhshi A: **Consequences of the t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: deregulated expression of a chimeric and mutated BCL-2 gene.** *Oncogene Res* 1988, **2**(3):263-275.
20. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P: **Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals.** *Leukemia* 2006, **20**(1):158-162.
21. Huet S, Sujobert P, Salles G: **From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma.** *Nat Rev Cancer* 2018, **18**(4):224-239.
22. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M, Jackman S, Krzywinski M, Scott DW, Trinh DL, Tamura-Wells J, Li S, Firme MR, Rogic S, Griffith M, Chan S, Yakovenko O, Meyer IM, Zhao EY, Smailus D, Moksa M, Chittaranjan S, Rimsza L, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Ben-Neriah S, Meissner B, Woolcock B, Boyle M, McDonald H, Tam A, Zhao Y, Delaney A, Zeng T, Tse K, Butterfield Y, Birol I, Holt R, Schein J, Horsman DE, Moore R, Jones SJ, Connors JM, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA: **Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma.** *Nature* 2011, **476**(7360):298-303.
23. Li H, Kaminski MS, Li Y, Yildiz M, Ouillet P, Jones S, Fox H, Jacobi K, Saiya-Cork K, Bixby D, Lebovic D, Roulston D, Shedden K, Sabel M, Marentette L, Cimmino V, Chang AE, Malek SN: **Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma.** *Blood* 2014, **123**(10):1487-1498.
24. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, Pan H, Jiang Y, Zhao C, Jiang M, Hu D, Agirre X, Niesvizky I, Lee JE, Chen HT, Ennishi D, Scott DW, Mottok A, Hother C, Liu S, Cao XJ, Tam W, Shaknovich R, Garcia BA, Gascoyne RD, Ge K, Shilatifard A, Elemento O, Nussenzweig A, Melnick AM, Wendel HG: **The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development.** *Nat Med* 2015, **21**(10):1199-1208.
25. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, Vlasevska S, Mo T, Tang H, Basso K, Ge K, Dalla-Favera R, Pasqualucci L: **Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis.** *Nat Med* 2015, **21**(10):1190-1198.
26. Jiang Y, Ortega-Molina A, Geng H, Ying HY, Hatzi K, Parsa S, McNally D, Wang L, Doane AS, Agirre X, Teater M, Meydan C, Li Z, Poloway D, Wang S, Ennishi D, Scott DW, Stengel KR, Kranz JE, Holson E, Sharma S, Young JW, Chu CS, Roeder RG, Shaknovich R, Hiebert SW, Gascoyne RD, Tam W, Elemento O, Wendel HG, Melnick AM: **CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas.** *Cancer Discov* 2017, **7**(1):38-53.
27. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R,

- Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA: **Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin.** *Nat Genet* 2010, **42**(2):181-185.
28. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland RA: **Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(49):20980-20985.
  29. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA: **Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation.** *Blood* 2011, **117**(8):2451-2459.
  30. Bodor C, O'Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H, Drexler HG, Montoto S, Lister AT, Gribben JG, Matolcsy A, Fitzgibbon J: **EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma.** *Leukemia* 2011, **25**(4):726-729.
  31. Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J, Lee AM, Clear A, Montoto S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA, Elemento O, Hills R, Gribben JG, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T, Gascoyne RD, Fitzgibbon J: **EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma.** *Blood* 2013, **122**(18):3165-3168.
  32. Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, Shen H, Yang SN, Wang L, Ezponda T, Martinez-Garcia E, Zhang H, Zheng Y, Verma SK, McCabe MT, Ott HM, Van Aller GS, Kruger RG, Liu Y, McHugh CF, Scott DW, Chung YR, Kelleher N, Shaknovich R, Creasy CL, Gascoyne RD, Wong KK, Cerchiatti L, Levine RL, Abdel-Wahab O, Licht JD, Elemento O, Melnick AM: **EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation.** *Cancer Cell* 2013, **23**(5):677-692.
  33. Bátai B, Lévai D., Gaál-Weisinger, J., Balogh, A., Gángó, A., Bödör, Cs., Nagy, N.: **A személyre szabott terápia új lehetősége follicularis lymphomában – Az EZH2 hiszton metil-transzferáz gátlása [New perspective in the personalized medicine of follicular lymphoma – Targeting the EZH2 histone methyltransferase].** *Hematológia-Transzfuziológia* 2018, **51**(2):61-70.
  34. Sermer D, Pasqualucci L, Wendel HG, Melnick A, Younes A: **Emerging epigenetic-modulating therapies in lymphoma.** *Nat Rev Clin Oncol* 2019, **16**(8):494-507.
  35. Okosun J, Wolfson RL, Wang J, Araf S, Wilkins L, Castellano BM, Escudero-Ibarz L, Al Seraihi AF, Richter J, Bernhart SH, Efeyan A, Iqbal S, Matthews J, Clear A, Guerra-Assuncao JA, Bodor C, Quentmeier H, Mansbridge C, Johnson P, Davies A, Strefford JC, Packham G, Barrans S, Jack A, Du MQ, Calaminici M, Lister TA, Auer R, Montoto S, Gribben JG, Siebert R, Chelala C, Zoncu R, Sabatini DM, Fitzgibbon J: **Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma.** *Nat Genet* 2016, **48**(2):183-188.
  36. Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL, Schatz JH, Mavrakis KJ, Jiang M, Liu X, Bruno J, Heguy A, Olshen AB, Socci ND, Teruya-Feldstein J, Weis-Garcia F, Tam W, Shaknovich R, Melnick A, Himanen JP, Chaganti RS, Wendel HG: **The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma.** *Cell* 2011, **147**(3):554-564.

37. Trinh DL, Scott DW, Morin RD, Mendez-Lago M, An J, Jones SJ, Mungall AJ, Zhao Y, Schein J, Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD, Marra MA: **Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma.** *Blood* 2013, **121**(18):3666-3674.
38. Heward JA, Kumar EA, Korfi K, Okosun J, Fitzgibbon J: **Precision medicine and lymphoma.** *Curr Opin Hematol* 2018, **25**(4):329-334.
39. Jerkeman M, Hallek M, Dreyling M, Thieblemont C, Kimby E, Staudt L: **Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies.** *J Intern Med* 2017, **282**(5):415-428.
40. Guadagnolo BA, Li S, Neuberg D, Ng A, Hua L, Silver B, Stevenson MA, Mauch P: **Long-term outcome and mortality trends in early-stage, Grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, **64**(3):928-934.
41. Solal-Celigny P, Bellei M, Marcheselli L, Pesce EA, Pileri S, McLaughlin P, Luminari S, Pro B, Montoto S, Ferreri AJ, Deconinck E, Milpied N, Gordon LI, Federico M: **Watchful waiting in low-tumor burden follicular lymphoma in the rituximab era: results of an F2-study database.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(31):3848-3853.
42. Dreyling M, Morschhauser F, Bouabdallah K, Bron D, Cunningham D, Assouline SE, Verhoef G, Linton K, Thieblemont C, Vitolo U, Hiemeyer F, Giurescu M, Garcia-Vargas J, Gorbachevsky I, Liu L, Koechert K, Pena C, Neves M, Childs BH, Zinzani PL: **Phase II study of copanlisib, a PI3K inhibitor, in relapsed or refractory, indolent or aggressive lymphoma.** *Ann Oncol* 2017, **28**(9):2169-2178.
43. Salles G, Schuster SJ, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Viardot A, Blum KA, Flowers CR, Jurczak WJ, Flinn IW, Kahl BS, Martin P, Kim Y, Shreay S, Will M, Sorensen B, Breuleux M, Zinzani PL, Gopal AK: **Efficacy and safety of idelalisib in patients with relapsed, rituximab- and alkylating agent-refractory follicular lymphoma: a subgroup analysis of a phase 2 study.** *Haematologica* 2017, **102**(4):e156-e159.
44. **Positive Results for Tazemetostat in Follicular Lymphoma.** *Cancer Discov* 2018, **8**(8):OF3.
45. Ribrag V, Kim WS, Bouabdallah R, Lim ST, Coiffier B, Illes A, Lemieux B, Dyer MJS, Offner F, Felloussi Z, Kloos I, Luan Y, Vezan R, Graef T, Morschhauser F: **Safety and efficacy of abexinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor, in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study.** *Haematologica* 2017, **102**(5):903-909.
46. Chen R, Frankel P, Popplewell L, Siddiqi T, Ruel N, Rotter A, Thomas SH, Mott M, Nathwani N, Htut M, Nademanee A, Forman SJ, Kirschbaum M: **A phase II study of vorinostat and rituximab for treatment of newly diagnosed and relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma.** *Haematologica* 2015, **100**(3):357-362.
47. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, Salles G, Vitolo U, Ladetto M, Committee EG: **Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 2016, **27**(suppl 5):v83-v90.
48. Bains P, Al Tourah A, Campbell BA, Pickles T, Gascoyne RD, Connors JM, Savage KJ: **Incidence of transformation to aggressive lymphoma in limited-stage follicular lymphoma treated with radiotherapy.** *Ann Oncol* 2013, **24**(2):428-432.
49. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, Vinnicombe S, Waters R, Rohatiner AZ, Lister TA: **Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(17):2426-2433.
50. Montoto S, Fitzgibbon J: **Transformation of indolent B-cell lymphomas.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(14):1827-1834.

51. Godfrey J, Leukam MJ, Smith SM: **An update in treating transformed lymphoma.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2018, **31**(3):251-261.
52. Sarkozy C, Maurer MJ, Link BK, Ghesquieres H, Nicolas E, Thompson CA, Traverse-Glehen A, Feldman AL, Allmer C, Slager SL, Ansell SM, Habermann TM, Bachy E, Cerhan JR, Salles G: **Cause of Death in Follicular Lymphoma in the First Decade of the Rituximab Era: A Pooled Analysis of French and US Cohorts.** *J Clin Oncol* 2019, **37**(2):144-152.
53. Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P: **Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade lymphoma.** *Eur J Immunol* 1999, **29**(4):1253-1264.
54. Okosun J, Montoto S, Fitzgibbon J: **The routes for transformation of follicular lymphoma.** *Curr Opin Hematol* 2016, **23**(4):385-391.
55. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, Warnke R, Thorstenson Y, Oefner PJ, Brown PO, Botstein D, Levy R: **Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(13):8886-8891.
56. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Levy R, Pinkel D, Lossos IS: **Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations.** *Blood* 2003, **101**(8):3109-3117.
57. Goldin LR, Bjorkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O: **Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia.** *Haematologica* 2009, **94**(5):647-653.
58. Goldin LR, Slager SL: **Familial CLL: genes and environment.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:339-345.
59. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P: **Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2000, **343**(26):1910-1916.
60. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggini A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Khiabanian H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi FM, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foa R, Dalla-Favera R, Gaidano G: **Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2013, **121**(8):1403-1412.
61. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, Buske C, Committee EG: **Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 2015, **26 Suppl 5**:v78-84.
62. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Chiorazzi N, Stilgenbauer S, Rai KR, Byrd JC, Eichhorst B, O'Brien S, Robak T, Seymour JF, Kipps TJ: **iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL.** *Blood* 2018, **131**(25):2745-2760.
63. Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D, Brown J, Chanan-Khan AA, Chavez JC, Coutre SE, Davis RS, Fletcher CD, Hill B, Kahl BS, Kamdar M, Kaplan LD, Khan N, Kipps TJ, Lim MS, Ma S, Malek S, Mato A, Mosse C, Shadman M, Siddiqi T, Stephens D, Sundaram S, Wagner N, Dwyer M, Sundar H: **Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 4.2020,**

- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2020, 18(2):185-217.**
64. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, Lopez A, Henriques AF, Sanchez ML, Jara-Acevedo M, Rasillo A, Gonzalez M, Fernandez-Navarro P, Vega T, Orfao A, Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL: **Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach.** *Blood* 2009, **114**(1):33-37.
  65. International CLLIPIwg: **An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data.** *Lancet Oncol* 2016, **17**(6):779-790.
  66. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, Buhler A, Edelmann J, Bergmann M, Hopfinger G, Hensel M, Hallek M, Dohner H, Stilgenbauer S: **TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(29):4473-4479.
  67. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, Buhler A, Bottcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jager U, Patten N, Wu L, Wenger MK, Fingerle-Rowson G, Lichter P, Cazzola M, Wendtner CM, Fink AM, Fischer K, Busch R, Hallek M, Dohner H: **Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial.** *Blood* 2014, **123**(21):3247-3254.
  68. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C: **The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype.** *Leukemia* 2009, **23**(1):117-124.
  69. Fésüs V, Eyupoglu E, Kiss R, Ádám E, Kozma A, Mátrai Z, Bödör C: **Az IGHV mutációanalízis jelentősége krónikus lymphocytás leukémiában.** *Hematológia-Transzfuziológia* 2018, **51**(1):22-29.
  70. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK: **Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 1999, **94**(6):1848-1854.
  71. Chai-Adisaksopha C, Brown JR: **FCR achieves long-term durable remissions in patients with IGHV-mutated CLL.** *Blood* 2017, **130**(21):2278-2282.
  72. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K: **Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.** *Cancer Cell* 2011, **20**(2):246-259.
  73. Gahn B, Schafer C, Neef J, Troff C, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Wormann B: **Detection of trisomy 12 and Rb-deletion in CD34+ cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 1997, **89**(12):4275-4281.
  74. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, Diop M, Scourzic L, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kikushige Y, Davi F, Lambert J, Gautheret D, Merle-Beral H, Sutton L, Dessen P, Solary E, Akashi K, Vainchenker W, Mercher T, Droin N, Ogawa S, Nguyen-Khac F, Bernard OA: **Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients.** *Cancer Discov* 2014, **4**(9):1088-1101.
  75. Marosvari D, Alpar D, Kiraly AP, Rajnai H, Reiniger L, Bodor C: **[The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia].** *Magy Onkol* 2016, **60**(2):118-125.
  76. Nadeu F, Diaz-Navarro A, Delgado J, Puente XS, Campo E: **Genomic and Epigenomic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia.** *Annu Rev Pathol* 2020, **15**:149-177.

77. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio JM, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yague J, Nicolas P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjose S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpi JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigo R, Bayes M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, Campo E: **Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia.** *Nature* 2011, **475**(7354):101-105.
78. Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C: **Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation.** *N Engl J Med* 2012, **366**(26):2530.
79. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca DS, Zhang L, Zhang W, Vartanov AR, Fernandes SM, Goldstein NR, Folco EG, Cibulskis K, Tesar B, Sievers QL, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub TR, Lander ES, Neuberger D, Brown JR, Getz G, Wu CJ: **SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2011, **365**(26):2497-2506.
80. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberger D, Brown JR, Getz G, Wu CJ: **Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia.** *Cell* 2013, **152**(4):714-726.
81. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero JI, Munar M, Rubio-Perez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando AA, Gelpi JL, Gonzalez B, Gonzalez S, Gonzalez M, Gut M, Hernandez-Rivas JM, Lopez-Guerra M, Martin-Garcia D, Navarro A, Nicolas P, Orozco M, Payer AR, Pinyol M, Pisano DG, Puente DA, Queiros AC, Quesada V, Romeo-Casabona CM, Royo C, Royo R, Rozman M, Russinol N, Salaverria I, Stamatopoulos K, Stunnenberg HG, Tamborero D, Terol MJ, Valencia A, Lopez-Bigas N, Torrents D, Gut I, Lopez-Guillermo A, Lopez-Otin C, Campo E: **Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia.** *Nature* 2015, **526**(7574):519-524.
82. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Martin-Garcia D, Bea S, Salaverria I, Oldreive C, Aymerich M, Suarez-Cisneros H, Rozman M, Villamor N, Colomer D, Lopez-Guillermo A, Gonzalez M, Alcoceba M, Terol MJ, Colado E, Puente XS, Lopez-Otin C, Enjuanes A, Campo E: **Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2016, **127**(17):2122-2130.
83. Hallek M: **Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment.** *Am J Hematol* 2019, **94**(11):1266-1287.
84. Ghia P, Hallek M: **Management of chronic lymphocytic leukemia.** *Haematologica* 2014, **99**(6):965-972.
85. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grunhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jager U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Buhler A, Winkler D, Zenz T, Bottcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Dohner H, Stilgenbauer S, International Group of I,

- German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study G: **Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial.** *Lancet* 2010, **376**(9747):1164-1174.
86. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, Langerbeins P, von Tresckow J, Engelke A, Maurer C, Kovacs G, Herling M, Tausch E, Kreuzer KA, Eichhorst B, Bottcher S, Seymour JF, Ghia P, Marlton P, Kneba M, Wendtner CM, Dohner H, Stilgenbauer S, Hallek M: **Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial.** *Blood* 2016, **127**(2):208-215.
  87. Robak T, Robak E: **New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies.** *BioDrugs* 2011, **25**(1):13-25.
  88. Schuh A, Becq J, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, Feller SM, Grocock R, Henderson S, Khrebtukova I, Kingsbury Z, Luo S, McBride D, Murray L, Menju T, Timbs A, Ross M, Taylor J, Bentley D: **Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns.** *Blood* 2012, **120**(20):4191-4196.
  89. Rossi D, Khiabanian H, Spina V, Ciardullo C, Bruscaggin A, Fama R, Rasi S, Monti S, Deambrogi C, De Paoli L, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foa R, Rabadan R, Gaidano G: **Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2014, **123**(14):2139-2147.
  90. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, Radova L, Smardova J, Pardy F, Doubek M, Brychtova Y, Mraz M, Plevova K, Diviskova E, Oltova A, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M: **Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia* 2015, **29**(4):877-885.
  91. Bosch F, Dalla-Favera R: **Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment.** *Nat Rev Clin Oncol* 2019, **16**(11):684-701.
  92. Gurbity Palfi T, Fesus V, Bodor C, Borbenyi Z: **[State of the art molecular diagnostics and therapy of chronic lymphocytic leukaemia in the era of new targeted therapies].** *Orv Hetil* 2017, **158**(41):1620-1629.
  93. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, Bairey O, Hillmen P, Bartlett NL, Li J, Simpson D, Grosicki S, Devereux S, McCarthy H, Coutre S, Quach H, Gaidano G, Maslyak Z, Stevens DA, Janssens A, Offner F, Mayer J, O'Dwyer M, Hellmann A, Schuh A, Siddiqi T, Polliack A, Tam CS, Suri D, Cheng M, Clow F, Styles L, James DF, Kipps TJ, Investigators R-: **Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia.** *N Engl J Med* 2015, **373**(25):2425-2437.
  94. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, Mendonca RV, Sweeney MD, Scott KC, Grothaus PG, Jeffery DA, Spoerke JM, Honigberg LA, Young PR, Dalrymple SA, Palmer JT: **Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase.** *ChemMedChem* 2007, **2**(1):58-61.
  95. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, Farooqui M, Wiestner A: **Ibrutinib inhibits BCR and NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL.** *Blood* 2014, **123**(21):3286-3295.
  96. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, Keating MJ, O'Brien S, Chiorazzi N, Burger JA: **The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo.** *Blood* 2012, **119**(5):1182-1189.

97. Jeyakumar D, O'Brien S: **B cell receptor inhibition as a target for CLL therapy.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2016, **29**(1):2-14.
98. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, Xue L, Li DH, Steggerda SM, Versele M, Dave SS, Zhang J, Yilmaz AS, Jaglowski SM, Blum KA, Lozanski A, Lozanski G, James DF, Barrientos JC, Lichter P, Stilgenbauer S, Buggy JJ, Chang BY, Johnson AJ, Byrd JC: **Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib.** *N Engl J Med* 2014, **370**(24):2286-2294.
99. Furman RR, Cheng S, Lu P, Setty M, Perez AR, Guo A, Racchumi J, Xu G, Wu H, Ma J, Steggerda SM, Coleman M, Leslie C, Wang YL: **Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2014, **370**(24):2352-2354.
100. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, Heerema NA, Zhao W, Coleman J, Jones D, Abruzzo L, Gordon A, Mantel R, Smith LL, McWhorter S, Davis M, Doong TJ, Ny F, Lucas M, Chase W, Jones JA, Flynn JM, Maddocks K, Rogers K, Jaglowski S, Andritsos LA, Awan FT, Blum KA, Grever MR, Lozanski G, Johnson AJ, Byrd JC: **BTK(C481S)-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia.** *J Clin Oncol* 2017, **35**(13):1437-1443.
101. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, Herman SE, Tian X, Maric I, Arthur DC, Wake L, Pittaluga S, Yuan CM, Stetler-Stevenson M, Soto S, Valdez J, Nierman P, Lotter J, Xi L, Raffeld M, Farooqui M, Albitar M, Wiestner A: **Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2017, **129**(11):1469-1479.
102. Pula B, Golos A, Gorniak P, Jamroziak K: **Overcoming Ibrutinib Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia.** *Cancers (Basel)* 2019, **11**(12).
103. Aczel D, Mátrai Z, Kiss R, Balogh A, Illes S, Bödör C, Alpar D: **Ibrutinibrezisztencia krónikus limfocitás leukémiában.** *Hematológia-Transzfuziológia* 2019, **52**(2):136-148.
104. Kotmayer L, Kallay K, Bodor C: **[Hereditary haematological malignancies].** *Magy Onkol* 2020, **64**(1):43-55.
105. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD: **Acute Myeloid Leukemia.** *N Engl J Med* 2015, **373**(12):1136-1152.
106. Churpek JE: **Familial myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2017, **30**(4):287-289.
107. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW: **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood* 2016, **127**(20):2391-2405.
108. Vainchenker W, Kralovics R: **Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms.** *Blood* 2017, **129**(6):667-679.
109. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T: **Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018.** *Blood Cancer J* 2018, **8**(1):2.
110. Vannucchi AM, Harrison CN: **Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms.** *Blood* 2017, **129**(6):693-703.
111. Skoda RC, Duek A, Grisouard J: **Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms.** *Exp Hematol* 2015, **43**(8):599-608.
112. Tefferi A, Barbui T: **Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management.** *Am J Hematol* 2019, **94**(1):133-143.
113. Tefferi A: **Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management.** *Am J Hematol* 2018, **93**(12):1551-1560.



114. Tefferi A, Guglielmelli P, Pardanani A, Vannucchi AM: **Myelofibrosis Treatment Algorithm 2018.** *Blood Cancer J* 2018, **8**(8):72.
115. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: **A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.** *Nature* 2005, **434**(7037):1144-1148.
116. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC: **A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.** *N Engl J Med* 2005, **352**(17):1779-1790.
117. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR, Cancer Genome P: **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** *Lancet* 2005, **365**(9464):1054-1061.
118. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG: **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** *Cancer Cell* 2005, **7**(4):387-397.
119. Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C, Abdelouahab H, Lacout C, Pasquier F, Willekens C, Rameau P, Lecluse Y, Micol JB, Constantinescu SN, Vainchenker W, Solary E, Giraudier S: **JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation.** *Blood* 2014, **124**(13):2104-2115.
120. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A: **MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients.** *Blood* 2006, **108**(10):3472-3476.
121. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL: **MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia.** *PLoS Med* 2006, **3**(7):e270.
122. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR: **MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort.** *Blood* 2008, **112**(1):141-149.
123. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJP, Harrison CN, Cross NCP, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR: **Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2.** *N Engl J Med* 2013, **369**(25):2391-2405.
124. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schonegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M,

- Kralovics R: **Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms.** *N Engl J Med* 2013, **369**(25):2379-2390.
125. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM: **CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum.** *Am J Hematol* 2014, **89**(5):453-456.
  126. Luo W, Yu Z: **Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs).** *Stem Cell Investig* 2015, **2**:16.
  127. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C, Sant'Antonio E, Abbonante V, Moccia F, Casetti IC, Bellini M, Renna MC, Roncoroni E, Fugazza E, Astori C, Boveri E, Rosti V, Barosi G, Balduini A, Cazzola M: **Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia* 2016, **30**(2):431-438.
  128. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanan A, Wolanskyj AP, Maffioli M, Casalone R, Pacilli A, Vannucchi AM, Passamonti F: **Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients.** *Am J Hematol* 2014, **89**(8):E121-124.
  129. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, Gryshkova V, Defour JP, Vertenoeil G, Ngo A, Koay A, Raslova H, Courtoy PJ, Choong ML, Plo I, Vainchenker W, Kralovics R, Constantinescu SN: **Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants.** *Blood* 2016, **127**(10):1325-1335.
  130. Stein H, Bob R, Durkop H, Erck C, Kampfe D, Kvasnicka HM, Martens H, Roth A, Streubel A: **A new monoclonal antibody (CAL2) detects CALRETICULIN mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded bone marrow biopsies.** *Leukemia* 2016, **30**(1):131-135.
  131. Andrici J, Farzin M, Clarkson A, Sioson L, Sheen A, Watson N, Toon CW, Kolet H, Stevenson W, Gill AJ: **Mutation specific immunohistochemistry is highly specific for the presence of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms.** *Pathology* 2016, **48**(4):319-324.
  132. Nomani L, Bodo J, Zhao X, Durkin L, Loghavi S, Hsi ED: **CAL2 Immunohistochemical Staining Accurately Identifies CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms.** *Am J Clin Pathol* 2016, **146**(4):431-438.
  133. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, Raugi G, Carrai V, Balliu M, Mannarelli C, Pacilli A, Calabresi L, Fjerza R, Pieri L, Bosi A, Manfredini R, Guglielmelli P: **Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value.** *Leukemia* 2014, **28**(9):1811-1818.
  134. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB, Hasselbalch HC: **The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype.** *Eur J Haematol* 2007, **79**(6):508-515.
  135. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM, Myeloproliferative Disorders Research C: **Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia.** *Haematologica* 2008, **93**(1):41-48.
  136. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, Antonioli E, Bosi A, Vannucchi AM: **JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis.** *Haematologica* 2009, **94**(1):144-146.
  137. Elala YC, Lasho TL, Gangat N, Finke C, Barraco D, Haider M, Abou Hussein AK, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanan A, Tefferi A: **Calreticulin variant stratified**

- driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia.** *Am J Hematol* 2016, **91**(5):503-506.
138. Alvarez-Larran A, Martinez D, Arenillas L, Rubio A, Arellano-Rodrigo E, Hernandez Boluda JC, Papaleo N, Caballero G, Martinez C, Ferrer-Marin F, Mata MI, Perez-Encinas M, Duran MA, Alonso JM, Carreno-Tarragona G, Alonso JM, Noya S, Magro E, Perez R, Lopez-Guerra M, Pastor-Galan I, Cervantes F, Besses C, Colomo L, Rozman M: **Essential thrombocythaemia with mutation in MPL: clinicopathological correlation and comparison with JAK2V617F-mutated and CALR-mutated genotypes.** *J Clin Pathol* 2018, **71**(11):975-980.
  139. Broseus J, Lippert E, Harutyunyan AS, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L, Milosevic JD, Haferlach T, Germing U, Luno E, Schnittger S, Kralovics R, Girodon F: **Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis.** *Leukemia* 2014, **28**(6):1374-1376.
  140. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Elena C, Casetti IC, Milanesi C, Sant'antonio E, Bellini M, Fugazza E, Renna MC, Boveri E, Astori C, Pascutto C, Kralovics R, Cazzola M, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative I: **JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes.** *Blood* 2014, **123**(10):1544-1551.
  141. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A: **CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons.** *Leukemia* 2014, **28**(7):1472-1477.
  142. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke CM, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani AD: **The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants.** *Blood* 2014, **124**(15):2465-2466.
  143. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, Fanelli T, Bosi A, Vannucchi AM, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative I: **Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia.** *Blood* 2014, **123**(10):1552-1555.
  144. Vannucchi AM, Verstovsek S, Guglielmelli P, Griesshammer M, Burn TC, Naim A, Paranagama D, Marker M, Gadbow B, Kiladjian JJ: **Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study.** *Ann Hematol* 2017, **96**(7):1113-1120.
  145. Hussein K, Bock O, Theophile K, von Neuhoff N, Buhr T, Schlue J, Busche G, Kreipe H: **JAK2(V617F) allele burden discriminates essential thrombocythemia from a subset of prefibrotic-stage primary myelofibrosis.** *Exp Hematol* 2009, **37**(10):1186-1193 e1187.
  146. Barosi G, Massa M, Campanelli R, Fois G, Catarsi P, Viarengo G, Villani L, Poletto V, Bosoni T, Magrini U, Gale RP, Rosti V: **Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease.** *Leuk Res* 2017, **60**:18-23.
  147. Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Palumbo GA, Breccia M, Sabattini E, Villari L, Riminucci M, Valli R, Catani L, Alimena G, Ottaviani E, Fama A, Martinelli G, Perricone M, Spinsanti M, Cavo M, Vianelli N, Palandri F: **Comparison of JAK2(V617F) -positive essential thrombocythaemia and early primary**

- myelofibrosis: The impact of mutation burden and histology.** *Hematol Oncol* 2018, **36**(1):269-275.
148. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Dellacasa CM, Salmoiraghi S, Delaini F, Rambaldi A, Barbui T: **JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera.** *Exp Hematol* 2009, **37**(9):1016-1021.
  149. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, Batai A, Dolgos J, Csomor J, Egyed M, Sipos A, Remenyi P, Tordai A, Masszi T: **Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations.** *Haematologica* 2014, **99**(7):1184-1190.
  150. Kjaer L, Cordua S, Holmstrom MO, Thomassen M, Kruse TA, Pallisgaard N, Larsen TS, de Stricker K, Skov V, Hasselbalch HC: **Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment.** *PLoS One* 2016, **11**(10):e0165336.
  151. Cavalloni C, Rumi E, Ferretti VV, Pietra D, Roncoroni E, Bellini M, Ciboddo M, Casetti IC, Landini B, Fugazza E, Troletti D, Astori C, Cazzola M: **Sequential evaluation of CALR mutant burden in patients with myeloproliferative neoplasms.** *Oncotarget* 2017, **8**(20):33416-33421.
  152. Anelli L, Zagaria A, Coccaro N, Tota G, Minervini A, Casieri P, Impera L, Minervini CF, Brunetti C, Ricco A, Orsini P, Cumbo C, Specchia G, Albano F: **Droplet digital PCR assay for quantifying of CALR mutant allelic burden in myeloproliferative neoplasms.** *Ann Hematol* 2016, **95**(9):1559-1560.
  153. Akpan IJ, Osman AEG, Drazer MW, Godley LA: **Hereditary Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis, Questions, and Controversies.** *Curr Hematol Malig Rep* 2018.
  154. Yamagata T, Maki K, Mitani K: **Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis.** *Int J Hematol* 2005, **82**(1):1-8.
  155. Mangan JK, Speck NA: **RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making.** *Crit Rev Oncog* 2011, **16**(1-2):77-91.
  156. Luddy RE, Champion LA, Schwartz AD: **A fatal myeloproliferative syndrome in a family with thrombocytopenia and platelet dysfunction.** *Cancer* 1978, **41**(5):1959-1963.
  157. Ho CY, Otterud B, Legare RD, Varvil T, Saxena R, DeHart DB, Kohler SE, Aster JC, Dowton SB, Li FP, Leppert M, Gilliland DG: **Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2.** *Blood* 1996, **87**(12):5218-5224.
  158. Dowton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP: **Studies of a familial platelet disorder.** *Blood* 1985, **65**(3):557-563.
  159. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG: **Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia.** *Nat Genet* 1999, **23**(2):166-175.
  160. West AH, Godley LA, Churpek JE: **Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations.** *Ann N Y Acad Sci* 2014, **1310**:111-118.
  161. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, Jackson SC, Poon MC, Sinclair GD, Leber B, Johnson PR, Macheta A, Yin JA, Barnett MJ, Lister TA,

- Fitzgibbon J: **Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy.** *Blood* 2008, **112**(12):4639-4645.
162. Collin M, Dickinson R, Bigley V: **Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation.** *Br J Haematol* 2015, **169**(2):173-187.
  163. Godley LA: **Inherited predisposition to acute myeloid leukemia.** *Semin Hematol* 2014, **51**(4):306-321.
  164. Green CL, Tawana K, Hills RK, Bodor C, Fitzgibbon J, Inglott S, Ancliff P, Burnett AK, Linch DC, Gale RE: **GATA2 mutations in sporadic and familial acute myeloid leukaemia patients with CEBPA mutations.** *Br J Haematol* 2013, **161**(5):701-705.
  165. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, Babic M, Lin M, Carmagnac A, Lee YK, Kok CH, Gagliardi L, Friend KL, Ekert PG, Butcher CM, Brown AL, Lewis ID, To LB, Timms AE, Storek J, Moore S, Altree M, Escher R, Bardy PG, Suthers GK, D'Andrea RJ, Horwitz MS, Scott HS: **Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia.** *Nat Genet* 2011, **43**(10):1012-1017.
  166. Hirabayashi S, Wlodarski MW, Kozyra E, Niemeyer CM: **Heterogeneity of GATA2-related myeloid neoplasms.** *Int J Hematol* 2017, **106**(2):175-182.
  167. Hsu AP, Sampiao EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, Frucht DM, Vinh DC, Auth RD, Freeman AF, Olivier KN, Uzel G, Zerbe CS, Spalding C, Pittaluga S, Raffeld M, Kuhns DB, Ding L, Paulson ML, Marciano BE, Gea-Banacloche JC, Orange JS, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD, Holland SM: **Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome.** *Blood* 2011, **118**(10):2653-2655.
  168. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, Dafou D, Kilo T, Smithson S, Lunt P, Murday VA, Hodgson S, Keenan R, Pilz DT, Martinez-Corral I, Makinen T, Mortimer PS, Jeffery S, Trembath RC, Mansour S: **Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome).** *Nat Genet* 2011, **43**(10):929-931.
  169. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, Arthur DC, Gu W, Gould CM, Brewer CC, Cowen EW, Freeman AF, Olivier KN, Uzel G, Zelazny AM, Daub JR, Spalding CD, Claypool RJ, Giri NK, Alter BP, Mace EM, Orange JS, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD, Holland SM: **GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity.** *Blood* 2014, **123**(6):809-821.
  170. Galera P, Hsu AP, Wang W, Droll S, Chen R, Schwartz JR, Klco JM, Arai S, Maese L, Zerbe C, Parta MJ, Young NS, Holland SM, Hickstein DD, Calvo KR: **Donor-derived MDS/AML in families with germline GATA2 mutation.** *Blood* 2018, **132**(18):1994-1998.
  171. Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, Arthur DC, Zerbe CS, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD, Rosenzweig SD, Braylan RC, Young NS, Holland SM, Calvo KR: **GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia.** *Blood* 2015, **125**(1):56-70.
  172. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B, Larochelle O, Petit A, Rohrlisch P, Ferrand C, Van Den Neste E, Poirel HA, Lamy T, Ouachee-Chardin M, Mansat-De Mas V, Corre J, Recher C, Plat G, Bachelier F, Donadieu J, Delabesse E: **High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia.** *Blood* 2013, **121**(5):822-829.
  173. Kirwan M, Vulliamy T, Marrone A, Walne AJ, Beswick R, Hillmen P, Kelly R, Stewart A, Bowen D, Schonland SO, Whittle AM, McVerry A, Gilleece M, Dokal I: **Defining**

- the pathogenic role of telomerase mutations in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia.** *Hum Mutat* 2009, **30**(11):1567-1573.
174. Nachmani D, Bothmer AH, Grisendi S, Mele A, Bothmer D, Lee JD, Monteleone E, Cheng K, Zhang Y, Bester AC, Guzzetti A, Mitchell CA, Mendez LM, Pozdnyakova O, Sportoletti P, Martelli MP, Vulliamy TJ, Safrá M, Schwartz S, Luzzatto L, Bluteau O, Soulier J, Darnell RB, Falini B, Dokal I, Ito K, Clohessy JG, Pandolfi PP: **Germline NPM1 mutations lead to altered rRNA 2'-O-methylation and cause dyskeratosis congenita.** *Nat Genet* 2019.
  175. Vulliamy TJ, Marrone A, Knight SW, Walne A, Mason PJ, Dokal I: **Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation.** *Blood* 2006, **107**(7):2680-2685.
  176. Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Chanock SJ, Nunez O, Sloan E, Young NS: **Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome.** *Blood* 2003, **102**(3):916-918.
  177. Vulliamy TJ, Walne A, Baskaradas A, Mason PJ, Marrone A, Dokal I: **Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure.** *Blood Cells Mol Dis* 2005, **34**(3):257-263.
  178. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS: **Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia.** *N Engl J Med* 2005, **352**(14):1413-1424.
  179. Kennedy AL, Shimamura A: **Genetic predisposition to MDS: clinical features and clonal evolution.** *Blood* 2019, **133**(10):1071-1085.
  180. Kennedy AL, Shimamura A: **Genetic predisposition to MDS: clinical features and clonal evolution.** *Blood* 2019.
  181. Cao P, Wang M, Wang F, Zhang Y, Zhang Y, Chen X, Tan Y, Ma X, Guo Y, Liu H: **Copy Number Monitoring from Tumor-Only Targeted Gene Sequencing in Hematological Malignancies.** *Blood* 2018, **132**(Suppl 1):4086-4086.
  182. Kiss R, Kosztolanyi S, Gango A, Szuhai K, Bodor C, Alpar D: **[Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research].** *Orv Hetil* 2018, **159**(15):583-592.
  183. Kiraly PA, Kallay K, Marosvari D, Benyo G, Szoke A, Csomor J, Bodor C: **[Clinical and genetic background of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia].** *Orv Hetil* 2016, **157**(8):283-289.
  184. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM: **Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells.** *N Engl J Med* 2004, **351**(21):2159-2169.
  185. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, Darzentas N, Giudicelli V, Lefranc MP, Langerak AW, Belessi C, Davi F, Stamatopoulos K: **Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations.** *Leukemia* 2017, **31**(7):1477-1481.
  186. Hall TA: **A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symposium Series* 1999(41):95-98.
  187. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.

188. Saunders CT, Wong WS, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK: **Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs.** *Bioinformatics* 2012, **28**(14):1811-1817.
189. Li H, Durbin R: **Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.** *Bioinformatics* 2009, **25**(14):1754-1760.
190. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ: **A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data.** *Nat Genet* 2011, **43**(5):491-498.
191. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G: **Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples.** *Nat Biotechnol* 2013, **31**(3):213-219.
192. Dayem Ullah AZ, Lemoine NR, Chelala C: **SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants (2012 update).** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(Web Server issue):W65-70.
193. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK: **VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing.** *Genome Res* 2012, **22**(3):568-576.
194. Nilsen G, Liestol K, Van Loo P, Moen Vollan HK, Eide MB, Rueda OM, Chin SF, Russell R, Baumbusch LO, Caldas C, Borresen-Dale AL, Lingjaerde OC: **Copynumber: Efficient algorithms for single- and multi-track copy number segmentation.** *BMC Genomics* 2012, **13**:591.
195. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**(4):406-425.
196. Van Loo P, Nordgard SH, Lingjaerde OC, Russnes HG, Rye IH, Sun W, Weigman VJ, Marynen P, Zetterberg A, Naume B, Perou CM, Borresen-Dale AL, Kristensen VN: **Allele-specific copy number analysis of tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(39):16910-16915.
197. Wilm A, Aw PP, Bertrand D, Yeo GH, Ong SH, Wong CH, Khor CC, Petric R, Hibberd ML, Nagarajan N: **LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(22):11189-11201.
198. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM: **A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3.** *Fly (Austin)* 2012, **6**(2):80-92.
199. Wang K, Li M, Hakonarson H: **ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(16):e164.
200. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M: **TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data.** *Hum Mutat* 2016, **37**(9):865-876.
201. Tikkanen T, Leroy B, Fournier JL, Risques RA, Malcikova J, Soussi T: **Seshat: A Web service for accurate annotation, validation, and analysis of TP53 variants generated by conventional and next-generation sequencing.** *Hum Mutat* 2018, **39**(7):925-933.
202. Okosun J, Bodor C, Wang J, Araf S, Yang CY, Pan C, Boller S, Cittaro D, Bozek M, Iqbal S, Matthews J, Wrench D, Marzec J, Tawana K, Popov N, O'Riain C, O'Shea D, Carlotti E, Davies A, Lawrie CH, Matolcsy A, Calaminici M, Norton A, Byers RJ, Mein

- C, Stupka E, Lister TA, Lenz G, Montoto S, Gribben JG, Fan Y, Grosschedl R, Chelala C, Fitzgibbon J: **Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma.** *Nat Genet* 2014, **46**(2):176-181.
203. Gango A, Alpar D, Galik B, Marosvari D, Kiss R, Fesus V, Aczel D, Eyupoglu E, Nagy N, Nagy A, Krizsan S, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Adam E, Tasnady S, Reti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Matrai Z, Bodor C: **Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib.** *Int J Cancer* 2020, **146**(1):85-93.
204. Kiss R, Alpar D, Gango A, Nagy N, Eyupoglu E, Aczel D, Matolcsy A, Csomor J, Matrai Z, Bodor C: **Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia.** *Haematologica* 2019, **104**(1):e38-e41.
205. Nadeu F, Clot G, Delgado J, Martin-Garcia D, Baumann T, Salaverria I, Bea S, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Suarez-Cisneros H, Aymerich M, Rozman M, Villamor N, Colomer D, Gonzalez M, Alcoceba M, Terol MJ, Navarro B, Colado E, Payer AR, Puente XS, Lopez-Otin C, Lopez-Guillermo A, Enjuanes A, Campo E: **Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia* 2018, **32**(3):645-653.
206. Fesus V, Marosvari D, Kajtar B, Kiraly PA, Demeter J, Gurbity Palfi T, Egyed M, Plander M, Farkas P, Matrai Z, Matolcsy A, Bodor C: **[TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia].** *Orv Hetil* 2017, **158**(6):220-228.
207. Gango A, Mozes R, Boha Z, Kajtar B, Timar B, Kiraly PA, Kiss R, Fesus V, Nagy N, Demeter J, Korosmezey G, Borbenyi Z, Marton I, Szoke A, Masszi T, Farkas P, Varkonyi J, Plander M, Posfai E, Egyed M, Pal K, Radvanyi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpar D, Bodor C: **Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms.** *Leuk Res* 2018, **65**:42-48.
208. Mozes R, Gango A, Sulak A, Vida L, Reiniger L, Timar B, Krenacs T, Alizadeh H, Masszi T, Gaal-Weisinger J, Demeter J, Csomor J, Matolcsy A, Kajtar B, Bodor C: **Calreticulin mutation specific CAL2 immunohistochemistry accurately identifies rare calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms.** *Pathology* 2019, **51**(3):301-307.
209. Tawana K, Wang J, Kiraly PA, Kallay K, Benyo G, Zombori M, Csomor J, Al Seraihi A, Rio-Machin A, Matolcsy A, Chelala C, Cavenagh J, Fitzgibbon J, Bodor C: **Recurrent somatic JAK-STAT pathway variants within a RUNX1-mutated pedigree.** *Eur J Hum Genet* 2017, **25**(8):1020-1024.
210. Bodor C, Renneville A, Smith M, Charazac A, Iqbal S, Etancelin P, Cavenagh J, Barnett MJ, Kramarzova K, Krishnan B, Matolcsy A, Preudhomme C, Fitzgibbon J, Owen C: **Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival.** *Haematologica* 2012, **97**(6):890-894.
211. Kiraly AP, Kallay K, Gango A, Kellner A, Egyed M, Szoke A, Kiss R, Valyi-Nagy I, Csomor J, Matolcsy A, Bodor C: **Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary.** *Pathol Oncol Res* 2018, **24**(1):83-88.
212. Kiss R, Papp G, Krizsan S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, Bátaí B, Mátrai Z, Bodor C, Alpar D: **[Screening for genomic copy number alterations in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification].** *Hematológia-Transzfuziológia* 2018, **51**(1).



213. Kotmayer L, Kiss R, Kiraly AP, Csomor J, Kallay K, Alpar D, Bodor C: **[Screening for genomic copy number alterations in a family suffering from myelodysplastic syndrome using multiplex ligation-dependent probe amplification]**. *Hematológia-Transzfuziológia* 2018, **51**(4.).
214. Federico M, Caballero Barrigon MD, Marcheselli L, Tarantino V, Manni M, Sarkozy C, Alonso-Alvarez S, Wondergem M, Cartron G, Lopez-Guillermo A, Issa D, Morschhauser F, Alcoceba M, Kimby E, Rusconi C, Chamuleau M, Holte H, Lockmer S, Montoto S, Gomes da Silva M, Aurer I, Zucca E, Paszkiewicz-Kozik E, Minoia C, Skrypets T, Blaker YN, Salles G, Coiffier B, Aristotle C: **Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis**. *Lancet Haematol* 2018, **5**(8):e359-e367.
215. Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Raffeld M: **Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma**. *Blood* 1998, **91**(12):4677-4685.
216. Davies AJ, Lee AM, Taylor C, Clear AJ, Goff LK, Iqbal S, Cuthbert-Heavens D, Calaminici M, Norton AJ, Lister TA, Fitzgibbon J: **A limited role for TP53 mutation in the transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma**. *Leukemia* 2005, **19**(8):1459-1465.
217. Fitzgibbon J, Iqbal S, Davies A, O'Shea D, Carlotti E, Chaplin T, Matthews J, Raghavan M, Norton A, Lister TA, Young BD: **Genome-wide detection of recurring sites of uniparental disomy in follicular and transformed follicular lymphoma**. *Leukemia* 2007, **21**(7):1514-1520.
218. O'Shea D, O'Riain C, Gupta M, Waters R, Yang Y, Wrench D, Gribben J, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Holte H, Cazier JB, Johnson NA, Campo E, Chan WC, Gascoyne RD, Young BD, Staudt LM, Lister TA, Fitzgibbon J: **Regions of acquired uniparental disomy at diagnosis of follicular lymphoma are associated with both overall survival and risk of transformation**. *Blood* 2009, **113**(10):2298-2301.
219. O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, Waters R, Carlotti E, Macdougall F, Gribben J, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Smeland EB, Johnson N, Campo E, Greiner TC, Chan WC, Gascoyne RD, Wright G, Staudt LM, Lister TA, Fitzgibbon J: **The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival**. *Blood* 2008, **112**(8):3126-3129.
220. Wrench D, Leighton P, Skibola CF, Conde L, Cazier JB, Matthews J, Iqbal S, Carlotti E, Bodor C, Montoto S, Calaminici M, Gribben JG, Lister TA, Fitzgibbon J: **SNP rs6457327 in the HLA region on chromosome 6p is predictive of the transformation of follicular lymphoma**. *Blood* 2011, **117**(11):3147-3150.
221. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB, Ouillet P, Trifonov V, Rossi D, Tabbo F, Ponzoni M, Chadburn A, Murty VV, Bhagat G, Gaidano G, Inghirami G, Malek SN, Rabadan R, Dalla-Favera R: **Genetics of follicular lymphoma transformation**. *Cell Rep* 2014, **6**(1):130-140.
222. Green MR, Kihira S, Liu CL, Nair RV, Salari R, Gentles AJ, Irish J, Stehr H, Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, Sanchez-Garcia I, Plevritis SK, Arber DA, Batzoglou S, Levy R, Alizadeh AA: **Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**(10):E1116-1125.
223. Matolcsy A, Warnke RA, Knowles DM: **Somatic mutations of the translocated bcl-2 gene are associated with morphologic transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma**. *Ann Oncol* 1997, **8 Suppl 2**:119-122.

224. Carlotti E, Wrench D, Matthews J, Iqbal S, Davies A, Norton A, Hart J, Lai R, Montoto S, Gribben JG, Lister TA, Fitzgibbon J: **Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone.** *Blood* 2009, **113**(15):3553-3557.
225. Lue JK, Amengual JE: **Emerging EZH2 Inhibitors and Their Application in Lymphoma.** *Curr Hematol Malig Rep* 2018, **13**(5):369-382.
226. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, Irish JM, Kihira S, Liu CL, Kela I, Hopmans ES, Myklebust JH, Ji H, Plevritis SK, Levy R, Alizadeh AA: **Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma.** *Blood* 2013, **121**(9):1604-1611.
227. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL: **EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations.** *Nature* 2012, **492**(7427):108-112.
228. Knutson SK, Wigle TJ, Warholc NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J, Scott MP, Jin L, Smith JJ, Olhava EJ, Chesworth R, Moyer MP, Richon VM, Copeland RA, Keilhack H, Pollock RM, Kuntz KW: **A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells.** *Nat Chem Biol* 2012, **8**(11):890-896.
229. Gango A, Batai B, Varga M, Kapczar D, Papp G, Marschalko M, Kuroli E, Schneider T, Csomor J, Matolcsy A, Bodor C, Szepesi A: **Concomitant 1p36 deletion and TNFRSF14 mutations in primary cutaneous follicle center lymphoma frequently expressing high levels of EZH2 protein.** *Virchows Arch* 2018, **473**(4):453-462.
230. Ricci JE, Chiche J: **Metabolic Reprogramming of Non-Hodgkin's B-Cell Lymphomas and Potential Therapeutic Strategies.** *Front Oncol* 2018, **8**:556.
231. Leeksa AC, Taylor J, Wu B, Gardner JR, He J, Nahas M, Gonen M, Alemayehu WG, Te Raa D, Walther T, Hullein J, Dietrich S, Claus R, de Boer F, de Heer K, Dubois J, Dampmann M, Durig J, van Oers MHJ, Geisler CH, Eldering E, Levine RL, Miller V, Mughal T, Lamanna N, Frattini MG, Heaney ML, Zelenetz A, Zenz T, Abdel-Wahab O, Kater AP: **Clonal diversity predicts adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia* 2019, **33**(2):390-402.
232. Guarini A, Peragine N, Messina M, Marinelli M, Ilari C, Cafforio L, Raponi S, Bonina S, Mariglia P, Mauro FR, Gaidano G, Del Giudice I, Foà R: **Unravelling the suboptimal response of TP53-mutated chronic lymphocytic leukaemia to ibrutinib.** *Br J Haematol* 2019, **184**(3):392-396.
233. Kanagal-Shamanna R, Jain P, Patel KP, Routbort M, Bueso-Ramos C, Alhalouli T, Khoury JD, Luthra R, Ferrajoli A, Keating M, Jain N, Burger J, Estrov Z, Wierda W, Kantarjian HM, Medeiros LJ: **Targeted multigene deep sequencing of Bruton tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic lymphocytic leukemia with disease progression and Richter transformation.** *Cancer* 2019, **125**(4):559-574.
234. Quinquenel A, Fornecker LM, Letestu R, Ysebaert L, Fleury C, Lazarian G, Dilhuydy MS, Nolle D, Guieze R, Feugier P, Roos-Weil D, Willems L, Michallet AS, Delmer A, Hormigos K, Levy V, Cymbalista F, Baran-Marszak F: **Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study.** *Blood* 2019, **134**(7):641-644.
235. Nadeu F, Royo R, Maura F, Dawson KJ, Dueso-Barroso A, Aymerich M, Pinyol M, Bea S, Lopez-Guillermo A, Delgado J, Puente XS, Campo E: **Minimal spatial heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis.** *Leukemia* 2020.

236. Rendeiro AF, Krausgruber T, Fortelny N, Zhao F, Penz T, Farlik M, Schuster LC, Neme A, Tasnady S, Reti M, Matrai Z, Alpar D, Bodor C, Schmidl C, Bock C: **Chromatin mapping and single-cell immune profiling define the temporal dynamics of ibrutinib response in CLL.** *Nat Commun* 2020, **11**(1):577.
237. Andrikovics H, Szilvasi A, Meggyesi N, Kiraly V, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Mikala G, Sipos A, Lovas N, Csukly Z, Matrai Z, Tamaska J, Tordai A, Masszi T: **[Role of the activating mutation Val617Phe of Janus kinase 2 gene in myeloproliferative diseases and significance of its detection].** *Orv Hetil* 2007, **148**(5):203-210.
238. Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, Bellosillo B, Carillo S, Haslam K, Kjaer L, Lippert E, Mansier O, Oppliger Leibundgut E, Percy MJ, Porret N, Palmqvist L, Schwarz J, McMullin MF, Schnittger S, Pallisgaard N, Hermouet S, Mpn, EuroNet MP: **Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms.** *Eur J Haematol* 2015, **95**(4):270-279.
239. Rajnai H, Bodor C, Reiniger L, Timar B, Csernus B, Szepesi A, Csomor J, Matolcsy A: **[Novel method in diagnosis of chronic myeloproliferative disorders--detection of JAK2 mutation].** *Orv Hetil* 2006, **147**(45):2175-2179.
240. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, Finke C, Score J, Gangat N, Mannarelli C, Ketterling RP, Rotunno G, Knudson RA, Susini MC, Laborde RR, Spolverini A, Pancrazzi A, Pieri L, Manfredini R, Tagliafico E, Zini R, Jones A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Pietra D, Rumi E, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Tefferi A: **Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.** *Leukemia* 2013, **27**(9):1861-1869.
241. Bienz M, Hueber PA, Trudeau V, Alenizi AM, Valdivieso R, Alom M, Balbay MD, Canda AE, Mouraviev V, Albala DM, El-Hakim A, Trinh QD, Latour M, Saad F, Zorn KC: **Prevalence and risk factors of contralateral extraprostatic extension in men undergoing radical prostatectomy for unilateral disease at biopsy: A global multi-institutional experience.** *Can Urol Assoc J* 2015, **9**(7-8):E434-438.
242. Mansier O, Migeon M, Saint-Lezer A, James C, Verger E, Robin M, Socie G, Bidet A, Mahon FX, Cassinat B, Lippert E: **Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation.** *J Mol Diagn* 2016, **18**(1):68-74.
243. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD: **Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation.** *Haematologica* 2014, **99**(2):276-281.
244. Al Seraihi AF, Rio-Machin A, Tawana K, Bodor C, Wang J, Nagano A, Heward JA, Iqbal S, Best S, Lea N, McLornan D, Kozyra EJ, Wlodarski MW, Niemeyer CM, Scott H, Hahn C, Ellison A, Tummala H, Cardoso SR, Vulliamy T, Dokal I, Butler T, Smith M, Cavenagh J, Fitzgibbon J: **GATA2 monoallelic expression underlies reduced penetrance in inherited GATA2-mutated MDS/AML.** *Leukemia* 2018, **32**(11):2502-2507.
245. Churpek JE, Lorenz R, Nedumgottil S, Onel K, Olopade OI, Sorrell A, Owen CJ, Bertuch AA, Godley LA: **Proposal for the clinical detection and management of patients and their family members with familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes.** *Leuk Lymphoma* 2013, **54**(1):28-35.
246. Godley LA, Shimamura A: **Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance.** *Blood* 2017, **130**(4):424-432.
247. Obrochta E, Godley LA: **Identifying patients with genetic predisposition to acute myeloid leukemia.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2018, **31**(4):373-378.
248. Baliakas P, Tesi B, Wartiovaara-Kautto U, Stray-Pedersen AR, Friis LS, Dybedal I, Hovland R, Jahnukainen K, Raaschou-Jensen K, Ljungman P, Rustad CF, Lautrup CK,

- Kilpivaara O, Kittang AO, Gr Nback K, Cammenga J, Hellstrom-Lindberg E, Andersen MK: **Nordic Guidelines for Germline Predisposition to Myeloid Neoplasms in Adults: Recommendations for Genetic Diagnosis, Clinical Management and Follow-up.** *Hemasphere* 2019, **3**(6):e321.
249. Rio-Machin A, Vulliamy T, Hug N, Walne A, Tawana K, Cardoso S, Ellison A, Pontikos N, Wang J, Tummala H, Al Seraihi AFH, Alnajar J, Bewicke-Copley F, Armes H, Barnett M, Bloor A, Bodor C, Bowen D, Fenaux P, Green A, Hallahan A, Hjorth-Hansen H, Hossain U, Killick S, Lawson S, Layton M, Male AM, Marsh J, Mehta P, Mous R, Nomdedeu JF, Owen C, Pavlu J, Payne EM, Protheroe RE, Preudhomme C, Pujol-Moix N, Renneville A, Russell N, Saggat A, Sciuccati G, Taussig D, Toze CL, Uyttebroeck A, Vandenberghe P, Schlegelberger B, Ripperger T, Steinemann D, Wu J, Mason J, Page P, Akiki S, Reay K, Cavenagh JD, Plagnol V, Caceres JF, Fitzgibbon J, Dokal I: **The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants.** *Nat Commun* 2020, **11**(1):1044.
250. Kiraly AP, Alpar D, Fesus V, Marosvari D, Matolcsy A, Bodor C: **[Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology].** *Magy Onkol* 2016, **60**(2):88-98.
251. Bodor C, Schneider T: **Follicularis lymphoma– útbán a személyre szabott és célzott kezelés felé. [Follicular lymphoma – a way to personalized and targeted therapy].** *Klinikai Onkologia* 2016, **3**(1):30-38.
252. Bodor C, Gango A, Schneider T: **Diffúz nagy b-sejtes lymphoma: úton a személyre szabott terápia felé. [Diffuse large b-cell lymphoma – a road to personal therapy].** *Klinikai Onkologia* 2017, **4**(1):33-41.
253. Fesus V, Nagy A, Alpar D, Bodor C: **Az adoptív sejttranszfer sikere a hematológiában: a kiméra antigénreceptorral felruházott T-sejtek.** *Hematológia-Transzfuziológia* 2019, **52**(3):178-187.
254. Mozes R, Gango A, Boha Z, Csomor J, Bodor C: **[The role of driver and subclonal mutations in pathogenesis of primary myelofibrosis].** *Magy Onkol* 2017, **61**(1):36-45.

## XI KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni hálámat szüleimnek és családomnak, akik gyökereket és szárnyakat adtak és lehetővé tették, hogy megvalósíthassam terveimet.

Külön köszönettel tartozom mentoromnak Matolcsy András Professzor Úrnak, aki még egyetemi hallgató koromban kutatócsoportjába fogadott, kompromisszumok nélküli szakmai igényességre tanított, tanácsaival irányt mutatott eddigi pályám során és mindenben támogatta tudományos tevékenységemet és szakmai pályafutásomat.

Köszönöm mentoromnak és barátomnak Jude Fitzgibbon Professzornak a közös felfedezések élményét és kutatócsoportjaink immár több mint egy évtizedes kollaborációját.

Külön köszönettel tartozom kollégámnak és barátomnak Alpár Donátnak, akinek szakmai támogatása és hozzájárulása az MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport első lépései óta töretlen.

Hálával tartozom kutatócsoportom valamennyi volt és jelenlegi tagjának, PhD hallgatóimnak és TDK hallgatóimnak az évek során nyújtott áldozatos munkájukért és az együtt töltött időért. Köszönöm Király Péternek, Marosvári Dórának, Mózes Rékának, Gángó Ambrusnak, Kiss Richárdnak, Nagy Ákosnak, Krizsán Szilviának, Aczél Dórának, Bedics Gábornak, Fésüs Viktóriának, Hegyi Lajosnak, Zajta Eriknek, Bárányné Pallag Adrienne-nek, Gróf Stefániának, Kremper Zsanettnak, Juhász-Nagy Laurának, Sárkány Andreának a lelkiismeretes munkát. Külön köszönöm rendkívül tehetséges TDK hallgatóimnak Kotmayer Lilinek és Bátai Bencének, hogy egyetemi tanulmányaik mellett is rendkívül értékes kutatómunkát végeztek

Őszinte tisztelettel köszönöm a Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság vezetőségének és teljes tagságának az évek során kialakult felbecsülhetetlen értékű kollaborációkat, amely lehetővé tette a legtöbb hazai hematológiai centrummal való aktív együttműködést. Ezek nélkül az értekezésben bemutatott eredmények töredéke sem valósulhatott volna meg.

Köszönöm a támogatását a Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi munkatársának, akikkel volt szerencsém együtt dolgozni az elmúlt 18 évben. Külön köszönöm az Intézet Hematopatológusainak támogatását, a termékeny szakmai vitákat és az együtt töltött időt. Köszönettel tartozom Csomor Juditnak, Szepesi Ágotának, Timár Botondnak, Rajnai Hajnalkának, Csernus Balázsnak.

Szeretnék köszönetet mondani valamennyi hazai és nemzetközi kollaborációs partnerünknek is.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom a kutatásainkat pályázatok útján támogató szervezeteknek, a Magyar Tudományos Akadémiának, a Semmelweis Egyetemnek, a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak, valamint az Európai Bizottságnak.